IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM ESPÉCIES SILVESTRES DE *ARACHIS*

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil;

Carolina Morgante
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil; EMBRAPA Semiárido, CP 23, Petrolina, PE – Brasil.;

Soraya Cristina Macedo Leal-Bertioli
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil;

Ana Cláudia Guerra Araújo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil;

Amanda Kristina Silva
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil; Universidade de Brasília, Campus I, Brasília, DF – Brasil;

Andressa Martins
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil;

David Bertioli
Universidade de Brasília, Campus I, Brasília, DF – Brasil; Universidade Católica de Brasília, Campus II, 916 Norte, Brasília, DF - Brasil.

Patrícia Messenberg Guimarães
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Parque Estação Biológica, CP 02372. Final W5 Norte, Brasília, DF – Brasil;

RESUMO - Os mecanismos de resposta desencadeados por plantas submetidas a condições de seca afetam o seu crescimento, causando sérias limitações à sua produtividade. As respostas da planta ao déficit hídrico têm sido assim uma das ações de pesquisa de interesse estratégico e tornaram-se uma importante temática do melhoramento genético de plantas. Devido à complexidade das respostas à seca, a análise em larga escala de sequências expressas pode contribuir para a identificação de genes associados aos mecanismos de tolerância à seca. O presente estudo visa estudar o perfil de expressão (transcritoma) e identificar genes responsivos ao déficit hídrico nas espécies silvestres de *Arachis magna* e *A. duranensis* submetidas a estresse hídrico gradual. A biblioteca SSH de *A. magna* gerou 759 etiquetas de sequências expressas (ESTs) dos quais 249 unigenes foram identificados. A biblioteca de *A. duranensis* sequenciada pela tecnologia Roche/454 obteve 380.601 sequências e resultou num total de 12.792 unigenes. A partir da análise *in silico* desses unigenes, 46 genes candidatos relacionados com a resposta à seca tiveram sua expressão validada por RT-qPCR. As informações produzidas neste estudo serão um recurso valioso para a identificação de genes, caracterização de novos alelos, e desenvolvimento de marcadores moleculares em amendoim.

Palavras-chave: *Arachis* spp.; seca; trancritoma; genes-candidatos; amendoim

INTRODUÇÃO

A identificação dos genes de uma determinada espécie vegetal, e de sua regulação temporal e espacial sob determinadas condições, permite uma compreensão de como características de importância agronômica são controladas, sendo um passo para a compreensão da herança dessas características. A resposta da planta aos estresses biótico e abiótico tem sido alvo de ações de pesquisa de interesse estratégico e tornou-se uma importante temática do melhoramento genético de plantas. A prospecção e a identificação de novos genes de resistência/tolerância a estresses em plantas, assim como sua disponibilização para programas de melhoramento genético são, portanto, prioridade de pesquisa a nível mundial. Para tanto, deve-se dispor todos os genes contidos em um determinado genoma dentro de uma perspectiva funcional, tanto em termos mais básicos, visando identificar qual proteína é codificada por cada gene, quanto no sentido mais amplo, decifrando o papel de cada gene no funcionamento geral da célula e do organismo. Paralelamente, o sequenciamento de genomas e a análise massal do transcritoma de várias espécies vegetais têm possibilitado a prospecção e identificação de novos genes de interesse, gerando um enorme acúmulo de informações e dados. Entretanto, a função biológica da grande maioria dos milhares de genes identificados em vários projetos genoma permanecem desconhecidas e o controle genético da maioria das características agronômicas ainda precisa ser determinado.

Torna-se, portanto, essencial a análise e validação dessas informações visando um estudo mais acurado da função biológica dos genes identificados. A identificação de genes expressos pela planta em resposta aos diferentes tipos de estresse é um dos passos críticos que levam a elucidação dos mecanismos de tolerância ao estresse hídrico. Até recentemente, a análise da

expressão dos genes limitava-se ao estudo de um gene de cada vez. Atualmente, os avanços nas tecnologias em larga escala de sequenciamento e de análise do transcritoma possibilitam o estudo simultâneo da expressão e da regulação de vários genes em diferentes processos biológicos. Em termos de plantas, essas informações nos permitem realizar comparações entre espécies, revelando importantes informações sobre estrutura de genomas e mecanismos de evolução, divergência e domesticação.

O presente estudo visa a utilização de tecnologias e estratégias avançadas na área de genômica funcional, especificamente no transcritoma, para buscar genes associados à resposta ao estresse hídrico em espécies silvestres de *Arachis* que possuem um comportamento conservador (mais tolerante) em relação à espécie cultivada (mais suscetível). Germoplasma silvestre constitui uma excelente fonte de genes de resistência e tolerância, que podem ser identificados e isolados para serem utilizados como marcadores moleculares em programas de seleção assistida ou serem introgredidos/introduzidos em espécies cultivadas, oferecendo importantes alternativas para o melhoramento do amendoim cultivado (*A. hypogaea*).

MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo da proposta, as seguintes etapas foram realizadas: (i) realização de ensaios de desidratação gradual e controlada (tipo *dry down*) com plantas de *Arachis magna* e *A. duranensis* em casa de vegetação; (ii) extração do RNA total a partir de raízes de plantas em condições de estresse hídrico e do respectivo controle irrigado regularmente; (iii) análise e preparo do material para sequenciamento pela tecnologia 454 para o material de *A. duranensis*; (iv) construção de uma biblioteca subtrativa (SSH) e sequenciamento pelo método Sanger para o material de *A. magna*; (v) análise *in silico* das sequências obtidas; (vi) identificação de sequências associadas à resposta ao estresse hídrico e (vii) validação da expressão dos genes candidatos por RT-qPCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O transcritoma de plantas de *A. magna* submetidas a estresse hídrico gradual, e seu respectivo controle não-estressado, foi analisado pela construção de duas bibliotecas subtrativas de cDNA (SSH). A análise *in silico* revelou 759 etiquetas de sequências expressas (ESTs) que foram agrupadas em 249 unigenes (138 *singlets* e 111 *contigs*), com um índice de novidade de 32,8%. Vários genes foram identificados como sendo regulados positiva- ou negativamente nas condições de estresse ou de controle. O perfil de expressão de alguns desses genes diferencialmente regulados foi validado pela técnica de RT-qPCR, utilizando o cDNA de raízes e folhas. Genes que codificam, por exemplo, *glycine descarboxilase*, *metallothionein-like protein*, *drought stress responsive protein* e duas proteínas desconhecidas são regulados positivamente durante o estresse hídrico enquanto que o gene que codifica para uma *disease responsive protein* é regulado negativamente durante o estresse hídrico. Assim, esses resultados revelaram que a expressão espacial e temporal desses genes estão fortemente correlacionados com os dados da análise *in silico* e com a resposta ao estresse. Os genes-candidatos de *A. magna* que se revelaram mais promissores serão, no futuro, introduzidos em plantas transgênicas modelo (como *Medicago truncatula*) ou alvo (amendoim) a fim de avaliar a regulação da sua expressão e o seu potencial papel nos mecanismos de resposta da planta ao estresse.

Dando continuidade às análises do transcritoma, mais recentemente, a equipe analisou o perfil global de expressão em dois tecidos (folha e raiz) de plantas de *A. duranensis* submetidas a estresse hídrico gradual, utilizando a tecnologia 454 de sequenciamento massal. Uma única meia-corrida de sequenciamento 454 GS-FLX- Titanium de duas bibliotecas de cDNA (plantas estressadas e não-estressadas) revelou 380.601 sequências com um tamanho médio de 293,24 nucleotídeos após limpeza. Depois do agrupamento (*clustering*) e da montagem (*assembly*), um total de 12.792 unigenes foram geradas para *A. duranensis*. A interpretação funcional das sequências obtidas foi realizada por atribuições de Gene Ontology (GO), mostrando uma cobertura para uma ampla gama de categorias GO. Mais de 29% dos *singlets* e dos *contigs* não tiveram correspondência no banco de dados públicos e um número significativo de sequências foi identificado como sendo diferencialmente expressos entre as duas bibliotecas. Assim como realizado para *A. magna*, o perfil de expressão temporal e espacial dos genes-candidatos de *A. duranensis* foi validado pela técnica de RT-qPCR. Um total de 18 genes candidatos mostrou-se significativamente regulado nas condições de estresse ou de controlo e dois deles (expansina e nitrilase) revelaram níveis elevados de expressão diferencial em plantas estressadas, confirmando o seu envolvimento em resposta seca.

CONCLUSÃO

O estudo do perfil de expressão em espécies silvestres de *Arachis* submetidas a estresse hídrico gradual possibilitará a rápida e eficiente identificação de genes e de suas interações durante os processos de estresse abiótico. A análise *in silico* dessas sequências poderá revelar genes-candidatos, auxiliando na construção de um quadro comparativo em termos transcricionais do processo de resposta e adaptação das plantas ao estresse hídrico, podendo ser integrado ao conhecimento atual da tolerância das plantas ao estresse abiótico. Os conhecimentos gerados proporcionarão importantes alternativas com potencial aplicação na biotecnologia (seleção assistida por marcadores, introgressão/introdução de genes candidatos no amendoim cultivado), visando o desenvolvimento de cultivares de amendoim mais tolerantes à seca e mais adaptadas a condições ambientais adversas. Através de estudos de sintenia e genômica comparativa, será possível também estender esses conhecimentos para outras culturas de importância econômica para o País. Até o momento, este é o único trabalho de análise de transcritoma de espécies silvestres de *Arachis* submetidas ao estresse hídrico.