

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
GENES CANDIDATOS PARA A  
TOLERÂNCIA À SECA EM CAFEIEIRO**

**FELIPE VINECKY**

**2009**

**FELIPE VINECKY**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES  
CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM  
CAFEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof<sup>o</sup>. Alan Carvalho Andrade

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Vinecky, Felipe.

Identificação e caracterização de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro / Felipe Vinecky. – Lavras : UFLA, 2009.

115 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Alan Carvalho Andrade.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. *Coffea canephora*. 3. Macroarranjo. 4. qPCR. 5. Estresses abióticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.88  
633.7391



À minha família, por todo amor e carinho, em especial aos meus pais,  
Václav e Ludmila, pela confiança depositada em mim;  
À minha irmã Bárbara, por todo carinho;  
À minha irmã Verônica, pelo apoio, incentivo e cuidados;  
À minha esposa Michelle, por todo amor, carinho, paciência e incentivo.

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Václav e Ludmila , pelo apoio, amor e encorajamento no que sempre faço.

À minha irmã Verônica, pela preocupação, amor, zelo, conselhos e ajuda nos momentos difíceis, e a minha irmã Bárbara, pelo carinho e amor.

À minha esposa Michelle, pelo carinho enorme, paciência, amor, perseverança, apoio e ... sem palavras...

À família Sarudiansky, a tia Elza pelo, carinho, preocupação e apoio, ao André, pela amizade e momentos de descontração e ao Yuri ,pelo apoio, ombro amigo, conselhos, ajuda e os momentos de diversão.

Ao Dr. Alan Carvalho Andrade, pela amizade, ensinamentos, confiança e credibilidade depositados ao longo destes anos de trabalho, sempre me apoiando para que as coisas realmente acontecessem.

Ao amigo Eder, pelo companheirismo, ajuda, sugestões, saídas de campo e momentos de sinuca.

Ao amigo Gabriel, pelas sugestões, apoio, conversas e por todo o trabalho feito para que eu pudesse concretizar o meu.

Às meninas do Laboratório, Kelly, Naty, Luciana, Mônica e Ingrid que trabalham ou trabalharam com café, pela ajuda, amizade e apoio dados desde o início dos trabalhos.

A todas do grupo “café com cana”, além dos já citados, também à Maria, Aline, Marryelle e Mariana, pelo apoio e momentos de descontração.

Ao pesquisador Pierre Marraccini, pelas sugestões, paciência e apoio durante toda execução deste trabalho.

Ao pessoal do LEM, pelos momentos de descontração e encorajamento.

Ao amigo Geraldo, que sempre teve a sua mão estendida para me ajudar em Lavras e nunca negou-me apoio desde o início deste mestrado.

Ao pessoal das repúblicas de Lavras, Geraldo, Kollien, Fernando (Carioca), Robson, Leonardo (Fanho), Bruno (Brow), Nilo, Paulo (GG), Pedro (Tchu-tchú), Ricardo (Zé) e Peter, pelo acolhimento, descontração e ajuda.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Alan, Dr. Pierre e Dr. Luciano por cederem parte do carnaval.

Ao programa de Mestrado em Biotecnologia Vegetal da UFLA, por me aceitar no referido curso.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro na conclusão de bolsa de Desenvolvimento Tecnológico Industrial.

Ao CBP&D-Café, pela concessão de bolsa de iniciação científica, o que possibilitou o despertar do meu interesse pela carreira científica.

À FINEP ,pelo apoio financeiro na execução do trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	9
CAPÍTULO 1: Construção de bibliotecas de cDNA e análises <i>in silico</i> para a identificação de genes responsivos ao estresse hídrico em cafeeiro .....	12
1 Resumo .....	12
2 Abstract .....	13
3 Introdução .....	14
4 Material e Métodos .....	21
4.1 Material vegetal e condições de cultivo .....	21
4.2 Extração e Quantificação do RNA .....	23
4.2.1 Extração do RNA total .....	23
4.2.2 Análise de qualidade e quantificação das alíquotas de RNA .....	24
4.2.3 Purificação do RNA mensageiro (mRNA) .....	25
4.3 Construção das bibliotecas de cDNA .....	26
4.4 Bioinformática .....	27
4.5 Análises <i>in silico</i> .....	27
5 Resultados e Discussão .....	24
5.1 Caracterização das bibliotecas de cDNA de café (SH2 e SH3) .....	24
5.2 Análises dos resultados de BLASTX dos clusters formados com seqüências de SH2 e SH3 .....	30
5.3 Análise dos resultados de BLASTX dos clusters de SH2 e SH3, com maior expressão <i>in silico</i> .....	31
5.4 Análise dos resultados de BLASTX dos clusters formados exclusivamente	

com ESTs de SH2, SH3 e SH2 SH3 .....	37
6 Conclusão .....	38
7 Referências Bibliográficas .....	38
CAPÍTULO 2: Identificação de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro, por meio de análises da expressão gênica com macroarranjos de cDNA.....	
1 Resumo .....	41
2 Abstract.....	43
3 Introdução .....	45
4 Material e Métodos .....	53
4.1 Confeção de Membranas de Alta Densidade (Macroarranjos) .....	53
4.2 Preparo das sondas para hibridização com os macroarranjos .....	53
4.3 Experimentos de hibridização com os macroarranjos.....	53
4.4 Aquisição dos dados de macroarranjos.....	53
4.5 Análise dos dados de macroarranjos.....	53
5 Resultados e Discussão .....	53
5.1 Avaliação de parâmetros ideais do software Array Gauge (Fuji) para a realização das análises .....	53
5.2 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22I x 22NI.....	60
5.3 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 14I x 14NI.....	61
5.4 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22I x 14I.....	63
5.5 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22NI x 14NI.....	65
5.6 Análise comparativa global dos dados de macroarranjos .....	67
5.7 Seleção de genes candidatos para a realização de novos experimentos.....	69

6 Conclusão .....	71
7 Referências Bibliográficas.....	71
CAPÍTULO 3: Análises da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (QPCR) de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro .....	77
1 Resumo .....	77
2 Abstract.....	78
3 Introdução .....	79
4 Material e Métodos .....	84
5 Resultados e Discussão .....	91
5.1 Análise dos resultados de qPCR para genes de café, pré-selecionados como diferenciais em experimentos de macroarranjos.....	91
6 Conclusão .....	109
Considerações Finais .....	110
7 Referências Bibliográficas.....	111

## RESUMO

VINECKY, Felipe. **Identificação e caracterização de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro**. 2009. 115 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

A cultura cafeeira é importante economicamente e amplamente explorada no Brasil. A área plantada está bem difundida em todo território, onde são produzidos *C. arabica* e *C. canephora*, dependendo da região plantada. De modo geral, seca e temperaturas desfavoráveis são as principais limitações climáticas à produção do cafeeiro. A importância de tais limitações deve aumentar, em função das mudanças reconhecidas no clima global e, também, porque a cafeicultura vem sendo expandida para regiões marginais onde secas e temperaturas desfavoráveis se constituem em grandes limitações à produção do café. Por isso a pesquisa científica com foco em minimizar os danos causados pelos estresses abióticos é de fundamental importância para a cafeicultura. O objetivo deste trabalho foi identificar genes candidatos para a tolerância à seca, utilizando diferentes estratégias. Inicialmente foi avaliada a expressão diferencial de genes de bibliotecas de folhas de café cultivado em condições de estresse hídrico, por meio de análises *in silico* dos dados do Genoma Café. Em seguida, foram realizados experimentos com hibridização de macroarranjos de cDNA de café a partir de RNA obtido de folhas de duas cultivares de café, uma tolerante ao estresse hídrico (Clone 14) e outra sensível (Clone 22), ambas submetidas a irrigação normal (controle) e a restrição no fornecimento de água. Por último, a expressão diferencial de 29 genes pré-selecionados nos experimentos de macroarranjo foi analisada, utilizando-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para as reações de qPCR as amostras utilizadas foram o Clone 22 irrigado e não irrigado e outros três clones tolerantes (Clone 14, 73 e 120 irrigados e não irrigados). Os resultados obtidos com as análises de qPCR, mostraram que a maioria dos genes testados apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos controle e não irrigado, confirmando os dados obtidos nos experimentos de macroarranjos. Todas as técnicas utilizadas neste trabalho, foram eficientes em identificar genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro, sendo que alguns genes apresentaram resultado positivo de expressão diferencial em todas as três metodologias utilizadas. Os

---

\* Comitê orientador: Alan Carvalho Andrade - EMBRAPA/UFLA (Orientador), Pierre Marraccini - CIRAD/EMPRAPA, Luciano Vilela Paiva - UFLA.

vários genes candidatos responsivos à seca em cafeeiro, identificados neste trabalho, permitem uma melhor compreensão das estratégias utilizadas pela planta para suportar o déficit hídrico e esses genes, podem também ser usados, para o melhoramento biotecnológico do cafeeiro. Além disto, marcadores moleculares associados à tolerância à seca em cafeeiro podem ser desenvolvidos com base nos genes candidatos identificados, visando-se um programa de melhoramento genético do cafeeiro, por seleção assistida.

## ABSTRACT

VINECKY, Felipe. **Identification and characterization of candidate genes for drought tolerance in coffee**. 2009. 115 p. Dissertation (Master in Plant Biotechnology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Coffee is economically important and widely cultivated in Brazil. The cultivated area is well distributed throughout the territory, whereby *C. arabica* and *C. canephora* are produced, depending on the region. Usually, drought and adverse temperatures are the major weather constraints to coffee production. The importance of such limitations should increase, according to the recognized global climate changes and also because coffee is being expanded to marginal areas where drought and temperatures are unfavorable and are major limitations for coffee production. Therefore research focused on minimizing the damage caused by abiotic stresses is of fundamental importance for coffee. The goal of this study was to identify candidate genes for drought tolerance in coffee by using different strategies. Initially, differential expression of genes from coffee cDNA libraries of leaves, obtained from plants cultivated under water stress conditions, was evaluated by an *in silico* analysis using the Coffee Genome Database. In addition, hybridization experiments with cDNA macroarrays of coffee were performed using RNA from leaves of two coffee varieties of *C. canephora*, one tolerant to drought stress (Clone 14) and one sensitive (Clone 22), both under normal irrigation (control) and restriction of water. Finally, the differential expression of 29 pre-selected genes with the macroarray experiments were examined using the technique of quantitative real time PCR (qPCR). For qPCR reactions the samples used were leaves of the Clone 22 irrigated and non irrigated and also from three other tolerant clones (Clone 14, 73 and 120 irrigated and not irrigated). Results obtained by the qPCR analysis, showed that most of the genes tested displayed differential expression between the treatments controlled and non irrigated conditions, confirming the data obtained with the macroarrays experiments. All techniques used in this study were efficient in indentifying candidate genes for drought tolerance in coffee, whereby some genes displayed positive results of differential expression by all three methodologies used. The several candidate genes for drought tolerance in coffee,

---

\* Guidance Committee: Alan Carvalho Andrade - EMBRAPA/UFLA (Major Professor), Pierre Marraccini - CIRAD/EMPRAPA, Luciano Vilela Paiva - UFLA.

identified in this work, allow a better understanding of the strategies used by the plant to sustain drought periods and such genes, may also be used for biotechnological coffee improvement. Besides, molecular markers associated with drought tolerance in coffee can be developed based on the candidate genes identified aiming at a breeding program based on marker-assisted selection.

## INTRODUÇÃO GERAL

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo tendo sido considerado o segundo item em importância no comércio internacional de “commodities”. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e é oriundo de regiões da África, que compreendem o sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. Este gênero contém aproximadamente 100 espécies, mas a produção comercial é baseada somente nas espécies, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta) (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2004), que representam aproximadamente 76 % e 24 % do mercado total de café, respectivamente (Companhia Nacional de Abastecimento - Conab, 2008).

O Brasil ocupa o posto de maior produtor de café do mundo com a marca de 42.512.000 milhões de sacas, bem à frente do Vietnã, segundo colocado com 15.500.000 sacas. A produção brasileira é maior que a soma das produções do Vietnã e da Colômbia juntos (2º e 3º colocados), e a participação destes três países na exportação mundial de café é respectivamente de 30,1%, 15,2% e 11,9%.

Em nosso país a área plantada está bem difundida em todo território. A região que possui as maiores plantações de *C. arabica* é o estado de Minas Gerais, de acordo com a Conab (2009). Isto se deve ao fato de a região mineira ser montanhosa, possuir clima adequado para o cultivo de café. Em se tratando de *C. canephora*, o estado que se destaca é o Espírito Santo (Conab, 2009), pois esta espécie é mais adequada às regiões litorâneas.

Refletindo as condições climáticas adversas observadas em 2007 no Estado de Minas Gerais, que se caracterizaram pela escassez de chuvas e temperaturas elevadas, com médias de temperaturas superiores aos índices históricos, principalmente nas fases de floração e enchimento de grãos, a produção de café no estado ficou aquém do potencial produtivo das lavouras nas

diferentes regiões produtoras, sendo necessário maior quantidade de frutos para a obtenção de uma saca de café beneficiado. Esta situação ficou mais evidente na região do Sul de Minas, onde as lavouras foram severamente atingidas pelas condições climáticas desfavoráveis, especialmente naquelas áreas de menor altitude e/ou de cerrado. Na Zona da Mata e no Jequitinhonha, as condições foram um pouco mais favoráveis, propiciando boas produtividades. Na região do Cerrado Mineiro, onde se concentra a maior área de café irrigado do Estado, os danos causados pelas altas temperaturas observadas durante o ciclo produtivo das lavouras, foram em parte minimizados pelos sistemas de irrigação. De maneira geral, no transcorrer da colheita em todo Estado, predominou céu claro e baixa umidade relativa do ar. No entanto, alguns municípios do Sul de Minas foram severamente castigados por chuvas de granizo em meados de setembro comprometendo o término da colheita e a produção da próxima safra nesses municípios (Conab, 2008).

Ainda segundo dados da Conab (2008), verificou-se um atraso da ordem de 30 a 40 dias no início dos trabalhos de colheita em relação à safra anterior. O atraso no início da colheita foi provocado por condições climáticas adversas decorrentes da estiagem ocorrida nos períodos de floração e formação dos “chumbinhos”, e do prolongamento das chuvas no período de maturação dos frutos. O atraso da colheita aliado às primeiras chuvas de verão de 2008, que naquele ano ocorreram a partir de meados de setembro, dificultou ainda mais a finalização da colheita em alguns municípios, especialmente no Sul de Minas.

De modo geral, seca e temperaturas desfavoráveis são as principais limitações climáticas à produção do cafeeiro. A importância de tais limitações deve aumentar, em função das mudanças reconhecidas no clima global e, também, porque a cafeicultura vem sendo expandida para regiões marginais onde secas e temperaturas desfavoráveis se constituem nas grandes limitações à produção do café (Damatta & Ramalho, 2006). Estes autores analisaram a

importância e as conseqüências da seca e da temperatura sobre a fisiologia e a produção do café.

Segundo Assad et al. (2004), caso sejam comprovados os cenários atuais preconizados pelos modelos do IPCC, considerando um aumento de 1°C, 3°C e 5,8°C na temperatura média anual do globo, o cultivo do café arábica nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná será drasticamente reduzido nos próximos 100 anos, se mantidas as condições genéticas e fisiológicas das atuais variedades. No caso de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, a restrição ao cultivo atingirá mais de 95% da área dos estados, praticamente inviabilizando a cultura do cafeeiro.

No Estado de Minas Gerais, o cultivo se restringirá a 28 municípios (em 2001 foram contabilizados 702 municípios produtores de café) e, no Estado de São Paulo, o cultivo será restrito a nove municípios (no ano de 2001 foram contabilizados 455 municípios produzindo café). Já no Estado de Goiás, considerando-se o aumento de até 3°C, o cafeeiro será considerado cultura de alto risco, mesmo com a irrigação exercendo a função de suprimento de água e regulador térmico. No Estado do Paraná haverá um deslocamento da área produtiva para a região Sul, mas mesmo assim, caso haja um aumento de 5,8°C na temperatura média anual haverá uma forte redução das áreas aptas para o cafeeiro, caindo de 70,4% para 25,2% (Assad et al., 2004).

Segundo revisão realizada por Damatta (2004a,b), as baixas temperaturas afetam a fotossíntese do cafeeiro e a sua produção, por meio dos fatores estomáticos e não estomáticos. Além disso, a concentração interna de CO<sub>2</sub> em plantas de café, aumenta logaritmicamente até 30°C e mais rapidamente até 35°C, indicando desta forma uma limitação térmica na fotossíntese. Semelhante a todas as outras plantas, o crescimento vegetativo do café é impulsionado pela irrigação. Para a cafeicultura em vários países, a seca é considerada o maior estresse ambiental afetando a produção cafeeira. A

fisiologia da planta em resposta ao estresse hídrico é complexa, ocorrendo diferentes modificações fisiológicas durante o estresse. Nos trópicos, especialmente, os episódios de seca são agravados pela alta radiação solar e elevadas temperaturas, de tal modo que a seca pode ser considerada como um estresse multidimensional (Damatta, 2004b).

Damatta et al. (2003) verificaram que o melhor rendimento de um clone tolerante à seca, comparado a um clone sensível, estava associado com a manutenção da área foliar em maiores potenciais hídricos, como consequência da menor condutância estomática (*gs*). Apesar disso, os determinantes moleculares das diferenças de tolerância a seca em café robusta ainda permanecem amplamente desconhecidos.

Clones de *C. canephora* com melhor rendimento e estabilidade durante a seca (clone 120), ou com capacidade de sobreviver a episódios de seca através de uma situação mais restrita do uso da água (clone 14), podem ser de grande valor para a cafeicultura. Os Clones 14 e 120 ainda apresentaram o crescimento radicular com maior profundidade quando comparados a outros dois clones sensíveis ao estresse, onde as raízes foram encontradas mais próximas à superfície (Pinheiro et al., 2005).

Embora a cafeicultura seja fortemente afetada pela seca, a maior parte do café no mundo tem sido cultivado por pequenos agricultores, em regiões onde o emprego da irrigação é uma exceção (Damatta & Ramalho, 2006). Além disso, mudanças no clima global poderão causar limitações no fornecimento de água para a produção cafeeira e os recursos hídricos podem se tornar ainda mais escassos em várias regiões. Neste contexto, a seleção de cultivares tolerantes à seca que possuam rendimentos aceitáveis, é de extrema importância. Todavia, seleções foram feitas, mas se conhece relativamente pouco sobre como os genótipos de café respondem morfológica e fisiologicamente ao estresse hídrico (Damatta, 2004b; Damatta & Ramalho, 2006).

O melhoramento genético convencional do cafeeiro tem obtido sucesso no atendimento do setor produtivo, e é realizado através dos métodos tradicionais de cruzamentos e seleção de progênies favoráveis. A obtenção de um novo cultivar de café demora cerca de 30 anos, pois a seleção envolve testes exaustivos para se avaliar as características desejáveis da progênie, seguidos de propagação dos indivíduos selecionados e avaliação em campo da planta adulta. Ao contrário da maioria das heranças monogênicas, tais como resistência à pragas e doenças, a complexidade e multiplicidade dos componentes genéticos envolvidos nas respostas aos estresses abióticos tornam a manipulação e o melhoramento genético convencional para essas características muito mais difícil (Wang et al., 2003).

O desenvolvimento de cultivares de café que possam suportar seca severa, com rendimentos aceitáveis sob o déficit de água, deve estar entre as prioridades dos programas de melhoramento genético do cafeeiro. No que diz respeito ao café robusta, os melhoristas selecionaram empiricamente alguns clones promissores, com o desempenho acima citado. As avaliações fisiológicas de algum destes clones, sugerem que as características de manutenção do status hídrico adequado (com uma combinação entre enraizamento e controle estomatal satisfatório), manutenção da área foliar (Damatta et al., 2003; Pinheiro et al., 2005), inclinações da folha e características bioquímicas, são muito importantes para a tolerância à seca.

Para estudos de café relacionados com a tolerância à seca, Fazuoli et al. (2007) destacou a importância de se considerar a origem dos materiais genéticos utilizados. Por exemplo, existe o Grupo Guineano, que compreende os cafés do tipo Kouilou originário da Costa do Marfim, Guiné e Oeste da África, cujas principais características são: internódios menores, frutos pequenos, maturação precoce dos frutos, sementes pequenas e com menor peso, peneira média baixa, altos teores de cafeína (em torno de 2,7%), e, na maior parte das plantas deste

grupo ocorre a suscetibilidade à ferrugem, tolerância à seca e a bebida tem qualidade inferior ao Grupo Congolês, sendo que a coloração dos brotos novos é freqüentemente bronze. Existem ainda os materiais genéticos do Grupo Congolês, provenientes da África Central que apresentam dois subgrupos. O subgrupo 1 (SG1) formado pelos tipos de café Robusta ou Híbridos entre os dois grupos (Kouilou x Robusta) e o subgrupo 2 (SG2) que corresponde ao café Robusta propriamente dito. Os representantes do grupo Congolês apresentam internódios longos, frutos grandes, maturação média a tardia dos frutos, sementes grandes, peso de sementes maiores do que as do Grupo Guineano, peneira média alta, menores teores de cafeína (em torno de 2,5%), maior resistência à ferrugem, suscetibilidade à seca, maior exigência em água, bebida de qualidade superior ao Grupo Guineano e a coloração das folhas novas é geralmente bronze ou marrom. As diferenças entre os subgrupos SG1 e SG2 não são muito pronunciadas, a não ser com relação ao tamanho das folhas e tolerância à seca.

A neutralização de espécies reativas de oxigênio, relacionada à tolerância ao estresse oxidativo (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004) e a habilidade em manter o transporte de assimilados (Praxedes et al., 2006), favorecem a sobrevivência das plantas em condições de seca. Estes processos ainda não estão totalmente elucidados em clones de café com tolerância à seca. Em suma, os dados disponíveis até o momento, sugerem que nenhum fator isolado é suficiente para prever a tolerância à seca em café, em termos de manutenção da produtividade em condições de regimes hídricos limitados. A combinação de características genéticas associadas ao favorecimento do status hídrico com mecanismos bioquímicos persistentes e adequados, os quais possam permitir um maior grau de tolerância dos tecidos vegetais à desidratação, pode ser a alternativa mais viável para a obtenção de materiais genéticos com

incremento de produtividade em uma faixa ampla de regimes com déficits hídricos (Praxedes et al., 2006).

Nos últimos 15 anos, considerável progresso nas pesquisas básicas em fisiologia vegetal do cafeeiro com foco nas relações hídricas e mecanismos de tolerância à seca, foi atingido. Entretanto, tanto em café, como para a maioria das culturas tropicais, ainda existe uma grande lacuna no conhecimento acerca da partição dos fotoassimilados (Praxedes et al., 2006), relações hormonais, metabolismo de nitrogênio e carbono, mecanismos de defesa contra os estresses oxidativos etc (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004). O uso de ferramentas moleculares para o estudo das respostas do cafeeiro aos estresses abióticos apresenta novas oportunidades para avanços na área de fisiologia molecular e maior entendimento dos mecanismos envolvidos na tolerância à seca (Damatta & Ramalho, 2006).

Para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares do cafeeiro, o Projeto Genoma Café, possibilitou a construção de um banco de dados contendo um Unigene com mais de 33.000 genes distintos, a partir de 250 mil ESTs (Expressed Sequence Tags ou Etiquetas de Seqüências Expressas) de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. A informação básica disponível, fornece uma rica fonte de informações para estudos da biologia e fisiologia das plantas de cafeeiro e certamente, facilitará a identificação e caracterização de genes de interesse agrônômico para auxiliar e acelerar o melhoramento genético desta importante cultura para o país (Vieira et al., 2006).

Análises *in silico* na base de dados do Projeto Genoma Café podem auxiliar na identificação de genes candidatos para a tolerância à seca. De acordo com Vinecky et al. (2005), após a realização de uma análise por tBlastn na Base de Dados do Genoma Café, utilizando-se um conjunto de seqüências protéicas já caracterizadas como envolvidas na resposta aos estresses abióticos (EREA), possibilitou a identificação de inúmeros ESTs presentes no conjunto Unigene-

CAFEST, apresentando alta similaridade de seqüências. Este fato, pode ser devido a conservação de seqüência primária entre os diferentes parálogos das proteínas pesquisadas e/ou à presença de vários alelos no genoma do café. No entanto, uma análise de distribuição dos “Best Hits”, indicaram que mais de 70% dos ESTs identificados apresentaram valores de e-value menores que  $e^{-50}$ , diferindo da distribuição de freqüência do Unigene-Cafest, o que sugere significância funcional das seqüências identificadas.

No capítulo 1, objetivou-se a identificação de genes envolvidos nas respostas do cafeeiro à seca, a partir da construção, seqüenciamento e análise de bibliotecas de cDNA, oriundas de mRNA extraído de folhas coletadas de plantas de *C. arabica* (estresse hídrico em campo) e de um clone tolerante à seca de *C. canephora* (estresse hídrico em vasos). Inicialmente, foram identificados genes de café com alta similaridade aos envolvidos na resposta aos estresses abióticos, previamente descritos e caracterizados em outras espécies vegetais (Vinecky et al., 2005). Posteriormente, utilizando-se a ferramenta para análise da expressão eletrônica (*in silico*), disponível na Base de dados do Genoma Café, estudos comparativos das bibliotecas SH2 (*C.arabica*) e SH3 (*C. canephora*), foram realizados. Essas análises permitiram a identificação de vários genes candidatos, com expressão “eletrônica” diferencial e associada à resposta ao estresse hídrico.

Outra técnica eficiente para a identificação de genes candidatos é a utilização de macroarranjos de DNA. Os macroarranjos de DNA, são feitos em membranas de náilon, utilizando-se produtos de PCR, os quais são depositados de maneira ordenada (Nguyen, 1995). Os arranjos são então hibridizados com uma alíquota de cDNA marcada com radioisótopos (sondas de cDNA), sendo que o sinal de hibridização é proporcional à concentração de um determinado mRNA na população original (Perret, 1998). O capítulo 2 descreve a utilização desta técnica para a identificação de genes envolvidos nas respostas do cafeeiro à seca, a partir da construção e análise de macroarranjos de cDNAs de café.

Após serem excluídos genes redundantes contidos na Base de dados do Genoma Café, foi contruído um conjunto Unigene a partir das seqüências das bibliotecas SH2 (*C.arabica*) e SH3 (*C. canephora*). Produtos de PCR correspondentes à clones representativos deste conjunto Unigene foram depositados nas membranas. Após as hibridizações, os resultados foram analisados com o auxílio de um software, permitindo a identificação de vários genes candidatos com expressão diferencial e potencialmente associados à resposta do cafeeiro ao estresse hídrico.

O capítulo 3 descreve a validação por PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), de alguns dos genes identificados nos experimentos de hibridização com macroarranjos. Foram realizadas reações de qPCR utilizando-se 29 pares de *primers* desenhados com base nas seqüências de genes candidatos previamente identificados. Nessas reações, a expressão gênica desses genes foi analisada utilizando-se cDNA proveniente dos clones de *C.canephora* (clones 14, 22, 73 e 120) nas condições, irrigada e não irrigada. Os resultados obtidos por qPCR confirmaram a expressão diferencial da maioria dos genes testados.

De maneira geral, as diferentes técnicas utilizadas neste trabalho foram eficientes e possibilitaram a identificação e caracterização de vários genes candidatos envolvidos na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSAD, E. D.; PINTO, H. S.; ZULLO JUNIOR, J.; ÁVILA, A. M. H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café mo Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, nov. 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café, safra 2008**: quarta estimativa. Brasília, DF, 2008. 17 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2009**: primeira estimativa. Brasília, DF, 2009. 19 p.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 86, n. 2/3, p. 99-114, Mar. 2004a.

DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 1-6, Jan./Apr. 2004b.

DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; PINHEIRO, H. A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 1, p. 111-117, Jan. 2003.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 55-81, Jan./Mar. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Relatório de gestão da Embrapa Café**. Brasília, DF, 2004. 142 p.

FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T.; MISTRO, J. C.; SILVAROLLA, M. B. Café robusta: uma nova opção para a cafeicultura paulista. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 71-74, jan. 2007.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 239-247, May 2002.

PERRET, E.; FERRÁN, E. A.; MARINX, O.; LIAUZUN, P.; DUMONT, X.; FOURNIER, J.; KAGHAD, M.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Improved differential screening approach to analyse transcriptional variations in organized cDNA libraries. **Gene**, Paris, v. 208, n. 2, p. 103-115, Feb. 1998.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; FONTES, E. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, Limerick, v. 167, n. 6, p. 1307-1314, Dec. 2004.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. de M.; LOUREIRO, M. E.; DUCATTI, C. Drought tolerance is associated with root depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora* Pierre. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 101-108, July 2005.

PRAXEDES, S. C.; DAMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E.; FERRÃO, M. A. G.; CORDEIRO, A. T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 263-273, July 2006.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; ARAUJO, A. H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C. A.; MARIN, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. de B.; MONTE, D. C.; GIGLIOTI, É. A.; KIMURA, E. T.; ROMAN, E.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; ALMEIDA, E. R. P.; JORGE, É. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, F. R. da; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; EL DORRY, H.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; LIMA, L. M.; CAMARGO, L. E. A.; PEREIRA, L. F. P.; COUTINHO, L. L.; LEMOS, M. V. F.; ROMAN, M. R.; MACHADO, M. A.; COSTA, M. M. C.; GROSSI-DE-SA, M. F.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; TINCO, M. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; VANSLUYS, M. A.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; EIRA, M. T. S. da; GUERREIRO, F. O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, R. L. B. C. de; HARAKAVA, R.; FILIPPI, S. B.; TSAI, S. M.; DI MAURO, S. M. Z.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.

VINECKY, F.; BRITO, K. M. de; SILVA, F. R. da; ANDRADE, A. C. Análise *in silico* de genes potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos, presentes na base de dados do Genoma Café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina, PR. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2005. CD-ROM.

WANG, W.; VINCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 1-14, Sept. 2003.

## CAPÍTULO 1

### CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE CDNA E ANÁLISES *IN SÍLICO* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE HÍDRICO EM CAFEIEIRO

#### 1 RESUMO

O cenário da cafeicultura mundial, mostra o quanto esta cultura é importante economicamente, para diversos países. Para o Brasil, que é o maior produtor e exportador de café, esta *commoditie* é a principal fonte de renda para pequenos produtores. A seca, que vem se tornando cada vez mais intensa ao longo dos anos, prejudica a produção desses agricultores, pois reduz a produtividade, podendo causar até a perda da lavoura. Para auxiliar o desenvolvimento de plantas tolerantes à seca, vários grupos de pesquisa buscam uma melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na resposta das plantas à seca. A construção e sequenciamento de bibliotecas ESTs (Expressed Sequence Tags ou Etiquetas de Sequências Expressas) é um meio rápido e efetivo de se obter informações acerca da maioria dos genes expressos. Neste sentido, bancos de dados de ESTs estão sendo utilizados para análises em larga escala da expressão gênica. O genoma funcional do cafeeiro realizado por meio do sequenciamento de cDNAs (ESTs) sintetizados a partir de material vegetal submetidos a diferentes tratamentos, cada uma constituindo uma biblioteca, possibilitou a construção de um amplo banco de dados de ESTs com sequencias de tres espécies distintas de *Coffea*. A base de dados do genoma café, se constitui em uma rica fonte de informações para estudos de biologia e fisiologia das plantas de cafeeiro. O objetivo do presente trabalho foi o de identificar genes candidatos potencialmente envolvidos na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro, a partir de uma análise *in silico* dos ESTs disponíveis na base de dados do genoma café. Para essas análises foram utilizadas comparações *in silico* entre as bibliotecas SH2 (*Coffea arabica*) e SH3 (*Coffea canephora*), com o auxílio das ferramentas de bioinformática presentes na base de dados do genoma café, como por exemplo a procura por biblioteca específica. Com a metodologia utilizada neste trabalho, vários genes candidatos para a resposta ao estresse hídrico em cafeeiro foram identificados e podem ser objeto de estudos experimentais posteriores, visando a seleção assistida por marcadores moleculares para a rápida obtenção de variedades de café tolerantes à seca.

## CHAPTER 1

### CONSTRUCTION OF CDNA LIBRARIES AND *IN SILICO* ANALYSIS TO IDENTIFY RESPONSIVE GENES TO WATER STRESS IN COFFEE

#### 1 ABSTRACT

The worldwide scenario of coffee, shows how this culture is economically important for many countries. For Brazil, the largest producer and exporter of coffee, the coffee commodity is a major source of income for small farmers. Drought, which has become increasingly intense over the years, affects the production of these farmers, as it reduces productivity and can even cause entire crop loss. Aiming at the development of drought tolerant crops, several research groups are currently studying the genetic factors involved in plant responses to drought. The construction and sequencing of EST libraries (Expressed Sequence Tags or Labels of Expressed Sequence) is a quick and effective way to obtain information about most expressed genes. Therefore, EST databases are being used for large-scale analysis of gene expression. The functional genome of coffee made available by cDNA sequencing (ESTs) synthesized from plant material submitted to different treatments, each forming a cDNA library, allowed the construction of a large EST database of three different *Coffea* species. The Coffee EST Database provides a rich source of information for studies of biology and physiology of coffee plants. The goal of this study was to identify genes potentially involved in response to water stress in coffee plants from an *in silico* analysis of ESTs available in the database of the coffee genome. The methodology was based on *in silico* comparisons between libraries SH2 (*Coffea arabica*) and SH3 (*Coffea canephora*), with the aid of bioinformatic tools available at the Coffee Genome Database, such as search for specific library, among others. With the methodology used in this study, several candidate genes for response to water stress in coffee have been identified and may be subject to further experimental studies aiming at the establishment of a breeding program based on assisted selection by molecular markers for quick development of drought tolerant varieties of coffee.

### 3 INTRODUÇÃO

Os projetos genoma funcional, que são utilizados para se analisar a expressão gênica, são realizados a partir de seqüências expressas (ESTs), as quais são obtidas a partir do seqüenciamento do DNA complementar (cDNA) derivado da transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) de um organismo, tecido ou ainda de um único tipo celular. As ESTs são caracterizadas por serem seqüenciadas uma única vez (single-pass) e por este motivo, incompletas. Ou seja, geralmente são pequenas, com cerca de 600 pares de bases (pb), e contêm seqüências parciais do mRNA de origem. Uma vez seqüenciadas as várias ESTs, torna-se possível a análise funcional dessa informação, não só para a identificação de genes de interesse, mas também para conhecer o padrão de expressão gênica em diferentes condições ambientais.

Segundo Perret et al. (1998), a concentração de mRNA de um determinado gene em relação à concentração total de mRNA da célula é um indicativo do quanto este gene está sendo expresso, isto é, do quanto a célula está investindo em seu maquinário bioquímico para produzir a proteína codificada por este gene. Assim, foram desenvolvidas metodologias para medir a concentração relativa de determinados transcritos.

Vários organismos de interesse científico e/ou econômico têm sido investigados através de ESTs. Em tomate (*Lycopersicon esculentum*), organismo utilizado como modelo para diversos estudos relacionado à biologia das plantas, foram obtidas mais de 150.000 ESTs a partir de 26 bibliotecas de cDNA (Hoeven et al., 2002). Estas seqüências estão sendo utilizadas para a identificação de genes específicos a tecidos e fases de desenvolvimento, e

também para se identificar genes expressos em resposta aos estresse bióticos e abióticos (The Institute for Genomic Research, 2001).

Com o avanço das tecnologias de seqüenciamento de DNA, existem também bibliotecas de ESTs de *Arabidopsis*, trigo, milho, arroz, cana-de-açúcar entre outras plantas. A maioria dos ESTs destes organismos encontram-se disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (1988).

A biologia molecular tem facilitado o estudo de plantas como a *Medicago truncatula* e *Lotus japonicum* (Handberg & Stougaard, 1992) por exemplo, permitiu a identificação de vários genes com expressão diferencial em simbioses. Para o estudo de genomas, com uma biblioteca de ESTs específica de nódulos de *M. truncatula*, 389 clones foram seqüenciados, sendo que 34,2% das seqüências não apresentaram similaridade significativa a seqüências já depositadas em bancos de dados. Entre os clones que apresentaram similaridade significativa com seqüências já depositadas, foram encontradas 26 nodulinas. Após a realização de *Northern blots* foi possível identificar genes relacionados á nodulação e genes específicos do nódulo (Gyorgyey et al., 2000).

A construção de bibliotecas de ESTs é um meio rápido e efetivo de se produzir seqüências parciais para a maioria dos genes expressos (Nogueira et al., 2003). A comparação de uma seqüência desconhecida com um vasto número de ESTs é um instrumento importante e poderoso da pesquisa genética (Ohlrogge & Benning, 2000), e bancos de dados destas seqüências estão sendo utilizados na montagem de ferramentas para a análise em larga escala da expressão gênica (Cushman & Bohnert, 2000).

O genoma funcional do cafeeiro realizado por meio do seqüenciamento de cDNAs (ESTs) sintetizados a partir de material vegetal submetidos a diferentes tratamentos cada uma constituindo uma biblioteca, possibilitou a construção de um banco de dados contendo um Unigene de mais de 33.000

ESTs (Expressed Sequence Tags ou Etiquetas de Sequências Expressas) distintos de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. A informação básica disponível fornece uma rica fonte de informações para estudos da biologia e fisiologia das plantas de cafeeiro e certamente, facilitará a identificação e caracterização de genes de interesse agrônomo para auxiliar e acelerar o melhoramento genético desta importante cultura para o país (Vieira et al., 2006).

Com a construção da base de dados, torna-se possível separar grupos gênicos potencialmente envolvidos na resposta do cafeeiro ao estresse hídrico. Nestes grupos estão presentes fatores de transcrição, osmoprotetores, moléculas de proteção, transportadores de íons, bioenergética, metabolismo secundário, proteínas desconhecidas e/ou putativas, transdução de sinais, além do metabolismo de nucleotídeos, proteínas e lipídeos.

Neste trabalho, realizou-se a identificação de genes envolvidos nas respostas do cafeeiro à seca, a partir da construção, seqüenciamento e análise de bibliotecas de cDNA, oriundas de mRNA extraído de folhas coletadas de plantas de *C. arabica* (estresse hídrico em campo) e de um clone tolerante à seca de *C. canephora* (estresse hídrico em vasos). Inicialmente, foram identificados genes de café com alta similaridade aos envolvidos na resposta aos estresses abióticos, previamente descritos e caracterizados em outras espécies vegetais (Vinecky et al., 2005). Posteriormente, utilizando-se a ferramenta para análise da expressão eletrônica (*in silico*), disponível na Base de dados do Genoma Café, estudos comparativos das bibliotecas SH2 (*C. arabica*) e SH3 (*C. canephora*), foram realizados. Essas análises permitiram a identificação de vários genes candidatos, com expressão “eletrônica” diferencial e associada à resposta ao estresse hídrico, os quais podem posteriormente, serem analisados experimentalmente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal e condições de cultivo

O material vegetal selecionado para a construção das bibliotecas de cDNA foi proveniente de plantas de *C. arabica* e *C. canephora*, submetidas a condições de estresse hídrico em campo e casa de vegetação (vasos), respectivamente.

Folhas de cafeeiros, submetidos ao déficit hídrico, foram coletadas, acondicionadas em tubos falcon, congeladas sob nitrogênio líquido, e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração de RNA.

#### •*Coffea arabica*

Amostras de folhas, ramos e meristema de *C. arabica* L. cv. Rubi MG1192 foram coletadas do terço médio de ramos de plantas submetidas ao estresse hídrico em condições de campo, provenientes de um experimento de café com irrigação controlada por Pivô Central, localizado na Embrapa Cerrados (Planaltina – DF). As coletas foram realizadas quando as plantas atingiram um potencial hídrico de antemanhã ( $\Psi_w\text{-am}$ ) de aproximadamente  $-3,0$  MPa (déficit hídrico).



FIGURA 1 Campo experimental da Embrapa Cerrados - Plantação de *C. arabica* cultivado em diferentes regimes hídricos.

•*Coffea canephora*

A partir de experimentos realizados na Universidade Federal de Viçosa, plantas do clone 14 (genótipo tolerante) de *Coffea canephora* foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos preenchidos com solo, esterco de curral curtido e areia, recebendo irrigação contínua e irradiação média controlada. Folhas de plantas de 10 meses de idade foram coletadas em condições de deficiência hídrica, imposta pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem um potencial hídrico ( $\Psi_{w-am}$ ) de aproximadamente  $-3,0$  MPa (déficit hídrico).



FIGURA 2 Planta de *C. canephora* clone 14 sob regime de stress hídrico em vaso.

## **4.2 Extração e Quantificação do RNA**

### **4.2.1 Extração do RNA total**

As paredes celulares foram rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares e as cadeias de ácidos nucléicos. Essa etapa foi realizada com o congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido (-196°C) e posterior quebra mecânica, pulverizando as folhas com o auxílio de um pistilo e um almofariz sempre manipulados em nitrogênio líquido.

Após a pulverização do tecido vegetal em nitrogênio líquido, com a temperatura sempre mantida baixa com Nitrogênio líquido, tanto no almofariz como ao transferir para o microtubo eppendorf, a extração do RNA foi realizada utilizando-se o protocolo do kit de extração CONCERT® (Invitrogen).

Foi adicionado ao microtubo, contendo tecido pulverizado, 500µl de CONCERT® e agitado em vórtex por 2 minutos para homogeneização. Os microtubos contendo os homogeinizados foram mantidos na horizontal por 5 min à temperatura ambiente. A fase sólida contendo componentes de parede

celular foi descartada após centrifugação por 2 minutos à 4°C e 16.100 g. A fase líquida foi transferida para novo tubo contendo 100µl de 5M NaCl e 300µl de clorofórmio para permitir a separação das moléculas protéicas e açúcares das cadeias nucleotídicas. Após nova homogeneização em vórtex, o tubo foi centrifugado por 10 min. 4°C/16.100 g o que possibilitou coletar a fase superior que continha os ácidos nucleicos em solução. A precipitação do RNA foi realizada com a adição de um volume de Isopropanol e após 30 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se outra centrifugação para pelletizar o RNA. O pélete foi lavado com 600 µl de etanol 70%, para retirada do excesso de sal e após a retirada do etanol, os microtubos contendo apenas o RNA foram colocados em banho seco à 37°C, até secar. O pélete foi ressuspensionado em 50 µl de água MQ autoclavada.

#### **4.2.2 Análise de qualidade e quantificação das alíquotas de RNA**

Realizou-se uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0% em TAE para análise de qualidade e para quantificação utilizou-se um espectrofotômetro.

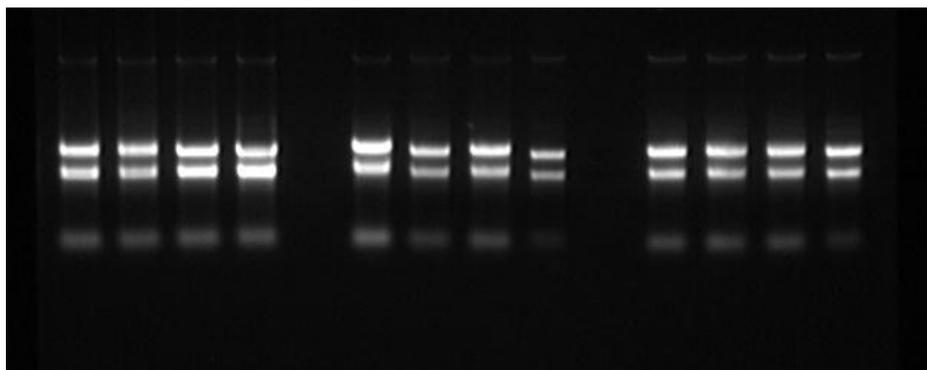


FIGURA 3 Análise de qualidade de RNA total em gel de agarose 1,0%.

#### **4.2.3 Purificação do RNA mensageiro (mRNA)**

A purificação do mRNA foi realizada a partir do anelamento da cauda poly-A com a cauda Poly-T existente nas esferas de resina, presentes no Kit Oligotex<sup>®</sup> da Qiagen, seguindo o protocolo do fabricante.

A solução OEB foi submetida a 70°C, para equilibrar a temperatura, a solução OBB foi colocada em estufa para dissolver SDS e a resina (oligotex) a 37°C para equilibrar a coluna.

A eficiência da purificação depende também da quantidade de RNA total, dessa forma, foi seguida uma tabela fornecida pelo fabricante que determina o volume de cada reagente a ser utilizado.

No microtubo em que continha o RNA, foi adicionado água, tampão OBB e resina. Essa mistura foi submetida a uma temperatura de 70°C em banho seco por 5 minutos para desnaturar as moléculas de RNA. Para se equilibrar a temperatura, a amostra foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por dois minutos e após descartado o sobrenadante (deixando 50 µl junto ao pélete) foi adicionado 400 µl de tampão OW2 para ressuspender o pélete. Toda a solução foi transferida para a coluna e centrifugada por um minuto. O que passou pela coluna foi descartado e procedeu-se novamente este passo. A coluna contendo a resina com o mRNA foi colocada em novo microtubo e para eluir o mRNA foram adicionados 30 µl de tampão OEB à coluna seguido de centrifugação por um minuto. Procedeu-se uma nova adição de tampão OEB para eluir por completo o mRNA presente na coluna. Após a segunda centrifugação a coluna foi descartada e o mRNA purificado, acondicionado no microtubo.

#### **4.3. Construção das bibliotecas de cDNA**

A biblioteca de cDNA foi obtida a partir de 1-2 µg poly(A) + RNA purificado dos tecidos de *C. arabica* (SH2) e *C. canephora* (SH3). A construção

dessas bibliotecas foi feita seguindo o protocolo do SuperScript II - Plasmid System and Plasmid Cloning Kit (Invitrogen) de acordo com Vieira et al. (2006). A eficiência da síntese de cDNA foi monitorada com nucleotídeos radioativos. O cDNA foi fracionado por diferença de tamanho utilizando uma coluna de Sepharose CL-2B. Frações contendo cDNA com mais de 500 pb foram ligadas em vetores pSPORT1 (Invitrogen), nos sítios de Sall-NotI. Os plasmídeos resultantes foram transformados por eletroporação em células de *E. coli* DH5α (Invitrogen).

O DNA plasmidial foi purificado utilizando um método modificado de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o ABI BigDye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems). As inserções de cDNA foram seqüenciados a partir da região 5' com o primer universal M13 REV, localizado no vetor pSPORT1. Os produtos da reação de seqüenciamento foram analisados em ABI 3700 sequencers (Applied Biosystems).

#### **4.4 Bioinformática**

O objetivo da bioinformática no Projeto Genoma Café, foi desenvolver um “pipeline” relacionado ao tratamento e manipulação dos dados, para atender às necessidades dos usuários. Para isso, uma base de dados relacional foi desenvolvida, a fim de anotar e acessar prontamente a informação, utilizando-se o sistema MySQL (My Structured Query Language, 1995).

A limpeza e a clusterização das seqüências ESTs, a visualização dos contigs, assim como das seqüências consenso resultantes, foram os principais tratamentos da bioinformática, no projeto Genoma Café.

A partir da submissão das seqüências para a Base de Dados, foram realizadas as seguintes etapas, seguindo os procedimentos de Telles & Silva (2001): 1. Análise da qualidade das seqüências; 2. Limpeza (Eliminação de seqüências ribossômicas, vetores, baixa qualidade, tamanho reduzido, etc); 3. Clusterização das seqüências; 4. Análises de BlastX contra a Base de dados do NCBI (centro nacional para a informação da biotecnologia), particularmente à base de dados (Non-redundante) de NR (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2006); 5. Armazenamento da informação.

#### 4.5 Análises *in silico*

As análises *in silico* foram feitas a partir da clusterização e montagem disponíveis na Base de Dados do Genoma Café (Embrapa, 2006). Os dados foram obtidos utilizando-se as ferramentas de listar bibliotecas disponíveis e consulta por biblioteca específica, utilizando-se SH2, SH3 e SH2 SH3 como palavras de procura. Para os cálculos de expressão relativa foram utilizados os valores de ocorrência de ESTs (SH2 ou SH3) para cada cluster, normalizado pelo número de ESTs válidos para cada biblioteca, multiplicado por 100. Para a biblioteca SH2 o valor total de ESTs válidos foi de 5053 e para SH3 foi 5743. A expressão relativa ao cluster mais expresso de cada biblioteca foi calculado, multiplicando-se o resultado anterior pelo fator 74,30882 e para SH3 pelo fator 37,535795. Esses valores foram calculados com base nos resultados dos clusters com maior ocorrência de ESTs das bibliotecas SH2 e SH3, respectivamente. Para SH2, o cluster mais expresso foi o contig 10569 (rubisco small subunit - *Coffea arabica*), com 68 ESTs de SH2, sendo o valor de 1,34 e portanto,  $100/1,34 = 74,30882$  e para SH3 o contig mais expresso foi o contig 15182 (oxidoreductase - *Arabidopsis thaliana*), sendo o valor de expressão normalizado de 2,66 e portanto,  $100/2,66 = 37,535795$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das bibliotecas de cDNA de café (SH2 e SH3)

Um sumário dos dados de ESTs produzidos pelas bibliotecas de cDNA denominadas SH2 e SH3, construídas no âmbito do Projeto Genoma Café, a partir de material vegetal submetido ao estresse hídrico é apresentado na Tabela 1. Esses dados foram obtidos após o processamento de bioinformática das seqüências EST de café, realizado pela equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa, 2006) e mostram que a partir de aproximadamente 15 mil seqüências gênicas produzidas por clones dessas duas bibliotecas, foi disponibilizado para análises posteriores, um conjunto de mais de 10 mil seqüências gênicas de boa qualidade (seq. > 350pb; *Phred* ≥ 20) e potencialmente envolvidas na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro. Além disto, o índice de novidade de 66,5 % (SH2) e 59,1 % (SH3) das sequencias destas bibliotecas, foi muito bom em se tratando de bibliotecas de folhas, onde a redundância é geralmente alta. A distribuição das seqüências nos contigs, apresentada na figura 4, também evidencia a baixa redundância.

TABELA 1 Resumo dos dados de ESTs produzidos a partir de material vegetal de café em condições de estresse hídrico.

<b>Bib.de cDNA</b>	<b>Total de seqs.</b>	<b>Tamanho ≥300 pb Phred&gt;20</b>	<b>Seqs. após trimagem.</b>	<b>Índice de novidade(%)</b>	<b>Clusters</b>
SH2	6824	5185 (75,98%)	5053	66,5	3360
SH3	7368	5886 (79,88%)	5743	59,1	3393

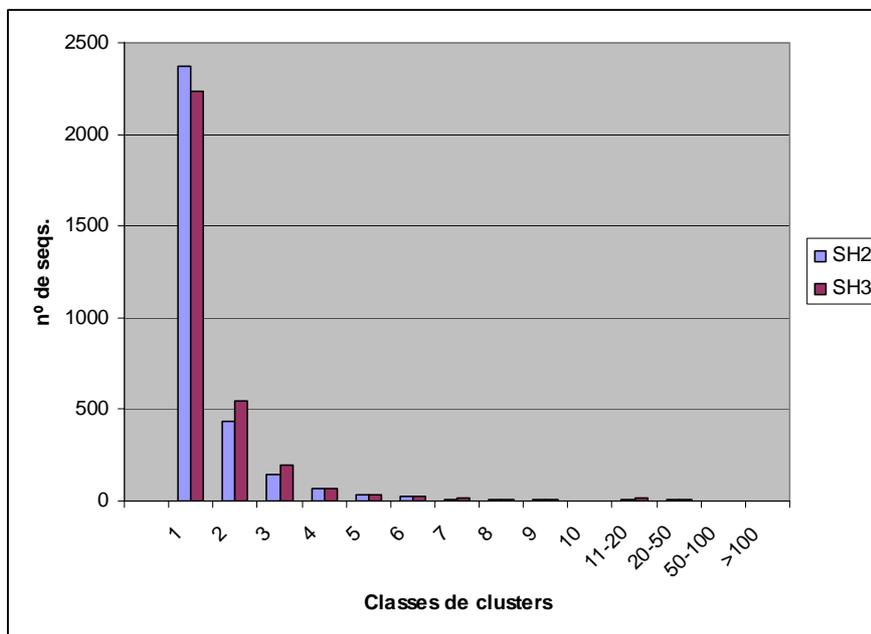


FIGURA 4 Distribuição dos clusters (Contigs) das bibliotecas de cDNA, SH2 e SH3 em função do número de seqüências presentes em cada cluster.

## 5.2 Análises dos resultados de BLASTX dos clusters formados com seqüências de SH2 e SH3

Analisando-se os dados apresentados na tabela 2, pode-se observar que dos 3.360 clusters formados com as ESTs provenientes da biblioteca SH2, 2675 são contigs e 685, singlets. O resultado das análises de BLASTX, indicam que, no caso dos contigs, 2.449 apresentaram similaridade com alguma seqüência presente na Base de Dados do NCBI ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ) e para 226 contigs a identificação dessa similaridade não foi possível. Já no caso dos singlets, 379 apresentaram resultado significativo de BLASTX, com a identificação de similaridade ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ) e 306 não apresentaram resultado significativo.

TABELA 2 Síntese dos resultados de BLASTX ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ) dos clusters formados com sequencias de SH2 e SH3.

	<b>SH2</b>	<b>SH3</b>	<b>SH2 SH3</b>	<b>Unigene Seca</b>
<b>Cluster</b>	3360	3393	-	6083
<b>Contigs</b>	2675	2625	670	4630
<b>Contigs com Blast hit</b>	2449	2421	642	4228
<b>Contigs No hit</b>	226	204	28	402
<b>Singlets</b>	685	768	-	1453
<b>Singlets com Blast hit</b>	379	472	-	851
<b>Singlets No hit</b>	306	296	-	602

Observa-se também que as ESTs da biblioteca SH3, foram agrupadas em 2625 contigs e 768 singlets, perfazendo assim um total de 3393 clusters. Os resultados de BLASTX com essas seqüências indicaram que 2421 contigs e 472 singlets apresentaram resultado significativo de BLASTX ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ), sendo que para 204 contigs e 296 singlets os resultados de BLASTX não foram significativos. A comparação dos clusters de SH2 e SH3, indica que 670 contigs são comuns, ou seja, são formados por ESTs tanto de SH2 como de SH3, e destes, 642 possuem resultado significativo de BLASTX e 28, não. Desta forma, o conjunto não redundante de ESTs provenientes de condições de estresse hídrico é de 4630 contigs e 1453 singlets, totalizando 6083 clusters provenientes da montagem cafEST.

### **5.3 Análise dos resultados de BLASTX dos clusters de SH2 e SH3, com maior expressão *in silico*.**

Considerando-se apenas os contigs com a ocorrência de mais de 4 ESTs, foi possível identificar 92 e 117 contigs provenientes das bibliotecas SH2 e SH3, respectivamente. Esse resultado indica que a maior parte dos contigs das

bibliotecas SH2 e SH3, são formados com poucos (1-4) ESTs dessas bibliotecas. Isto pode ser verificado também, analisando-se a distribuição dos ESTs nos clusters conforme apresentado na figura 4. Deste total de 209 contigs, com mais de 4 ESTs das bibliotecas SH2 e SH3, verifica-se que 26 são comuns e ocorrem nas duas bibliotecas (SH2 e SH3) e 183 são exclusivos e apresentam somente ESTs de SH2 ou SH3. A figura 5 apresenta a expressão relativa desses 26 contigs nas bibliotecas SH2 e SH3 e a tabela 3, apresenta o melhor resultado de BLASTX, correspondente, para cada um desses 26 contigs. Pode-se observar nesta lista a ocorrência de genes já caracterizados como envolvidos na resposta ao estresse hídrico em outras espécies vegetais, como por exemplo, a catalase (contig 9073) e a proteína CDSP32 (contig 18601), entre outros.

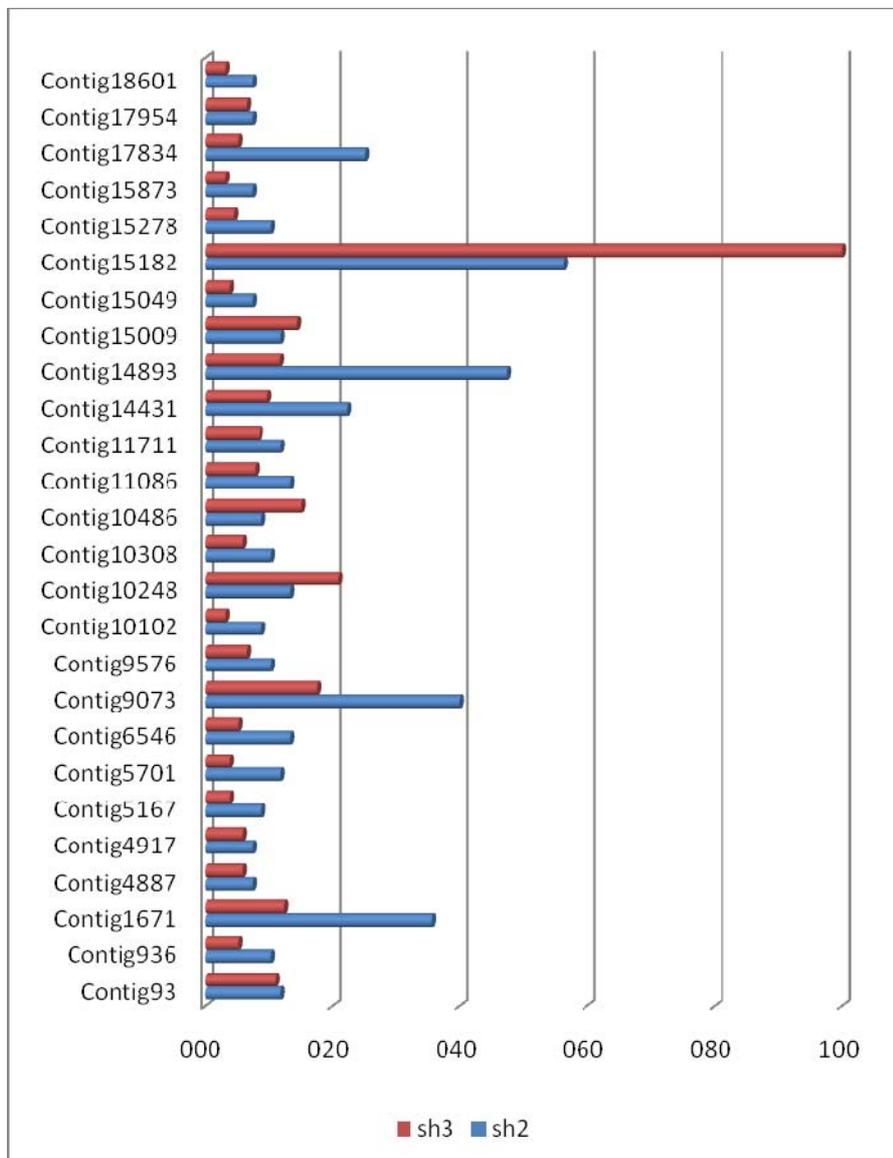


FIGURA 5 Dados de expressão relativa ao cluster mais expresso de cada biblioteca, para os 26 clusters comuns às bibliotecas SH2 e SH3.

TABELA 3 Resultados de BLASTX dos 26 clusters comuns às bibliotecas SH2 e SH3, com expressão *in silico* maior que 4 ESTs.

Contig	Melhor Blast Hit
Contig93	gb AAQ56195.1  aminotransferase 2 [Cucumis melo]
Contig936	gb ABA86964.1  glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit [Glycine max]
Contig1671	No Hit
Contig4887	emb CAA66667.1  polyubiquitin [Pinus sylvestris]
Contig4917	gb AAV89374.1  beta-amylase 1 [Nicotiana langsdorffii x Nicotiana glauca]
Contig5167	gb AAD27877.1  LHCl type III chlorophyll a/b binding protein [Vigna radiata]
Contig5701	gb ABG73417.1  chloroplast pigment-binding protein CP26 [Nicotiana tabacum]
Contig6546	emb CAA62364.1  L1 protein [Arabidopsis thaliana]
Contig9073	emb CAA85426.1  catalase [Nicotiana plumbaginifolia]
Contig9576	dbj BAD45891.1  polyubiquitin [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig10102	gb AAA34140.1  chlorophyll a/b-binding protein
Contig10248	gb AAA18529.1  chlorophyll A/B binding protein
Contig10308	gb AAM22683.1  carbonic anhydrase [Gossypium hirsutum]
Contig10486	gb ABC59515.1  chloroplast photosystem II 22 kDa component [Nicotiana benthamiana]
Contig11086	dbj BAA03131.1  glycolate oxidase [Cucurbita cv. Kurokawa Amakuri]
Contig11711	emb CAB16918.1  P-Protein precursor [Solanum tuberosum]
Contig14431	emb CAA36380.1  unnamed protein product [Gossypium hirsutum]
Contig14893	gb ABE83482.1  AAA ATPase, central region; Homeodomain-like [Medicago truncatula]
Contig15009	emb CAB51533.1  galactinol synthase, isoform GalS1 [Ajuga reptans]
Contig15049	gb ABE83728.1  Ferric reductase-like transmembrane component [Medicago truncatula]
Contig15182	ref NP_179721.1  oxidoreductase [Arabidopsis thaliana]
Contig15278	gb ABA96025.1  flavin-containing monooxygenase, putative [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig15873	ref NP_567574.1  ATP binding/ kinase/ protein serine/threoninekinase/ protein-tyrosine kinase [A.thaliana]
Contig17834	gb ABE83482.1  AAA ATPase, central region; Homeodomain-like [Medicago truncatula]
Contig17954	sp P09043  G3PA_TOBAC Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor
Contig18601	emb CAA71103.1  CDSF32 protein (Chloroplast Drought-induced Stress Protein of 32kDa) [Stuberosum]

Já a figura 6, apresenta a expressão relativa *in silico* dos 20 contigs mais expressos das bibliotecas SH2 e SH3. O melhor resultado de BLASTX correspondente a cada um desses contigs está listado na tabela 4. Analisando-se os dados apresentados na figura 6 pode-se observar que o contig 10659 é o que apresenta maior expressão *in silico*, nesta biblioteca. O resultado de BLASTX para esse contig (tabela 4) indica similaridade com a rubisco, resultado esperado, uma vez que a biblioteca SH2 foi construída a partir de RNA total extraído de folhas, predominantemente. Já no caso da biblioteca SH3, o contig com maior expressão *in silico*, contig 15182, apresenta similaridade com a uma putativa NADPH dependent mannose 6-phosphate reductase, sendo o contig com

similaridade com a rubisco o 3º mais expresso, nesta biblioteca. Este dado pode ter significado biológico, uma vez que a biblioteca SH3 foi construída a partir de material vegetal de um clone de conillon, previamente caracterizado como tolerante à seca. Além disto, os dados de expressão *in silico*, na biblioteca SH2 (3º mais expresso) é mais um indicativo de que o contig 15182 pode estar envolvido na resposta ao estresse hídrico em café. Por último, a diferença dos contigs com similaridade à rubisco, pode ser também explicado pela diferença dos materiais genéticos utilizados para a construção das bibliotecas.

Além do contig 15182, mencionado acima, 4 outros aparecem na lista dos 20 genes mais expressos, tanto nas bibliotecas de SH2 e SH3 e são potenciais candidatos para o envolvimento na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro (figura 6). A presença de um contig com similaridade a uma catalase (contig 9073), nesta lista, corrobora com o potencial envolvimento desses genes na proteção ao mecanismo oxidativo causado pelo estresse hídrico.

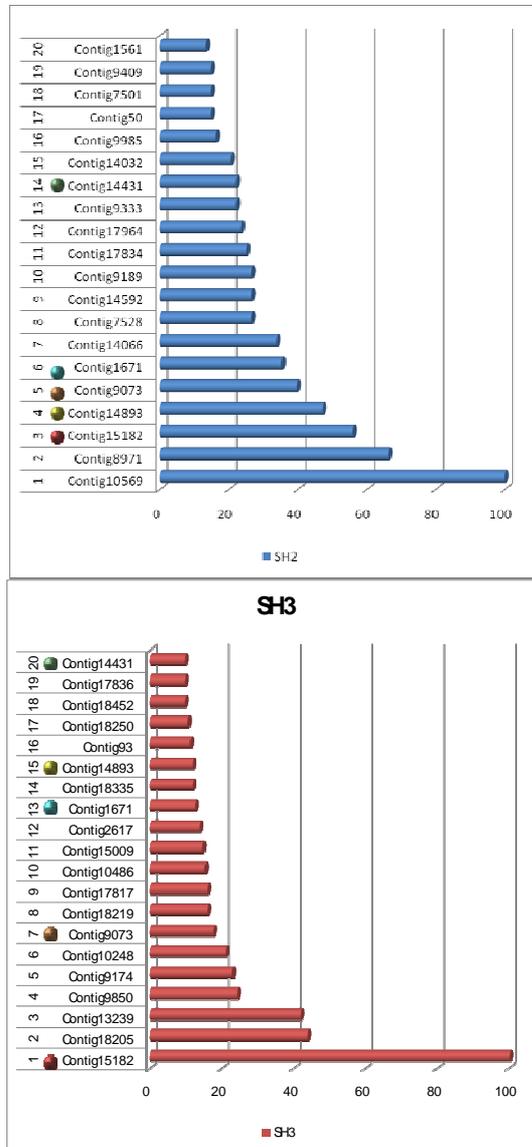


FIGURA 6 Dados de expressão relativa ao cluster mais expresso de cada biblioteca, para os 20 clusters com maior expressão *in silico* das bibliotecas SH2 e SH3. As esferas ilustram os clusters comuns às duas bibliotecas.

TABELA 4 Resultados de BLASTX dos 20 clusters com maior expressão *in silico* nas bibliotecas SH2 (painel superior) e SH3 (painel inferior). As setas apontam os clusters comuns às duas bibliotecas (SH2 e SH3).

<b>SH2</b>			
<b>Contig</b>		<b>Melhor Blast Hit</b>	
Contig50		gb  AAB31705.1  photosystem I subunit PS-E [Nicotiana sylvestris]	
Contig1561		gb  ABE87096.1  Glycoside hydrolase, family 18 [Medicago truncatula]	
→ Contig1671		No Hit	
Contig7501		gb  AAL01886.1  chitinase 3-like protein precursor [Trichosanthes kirilowii]	
Contig7528		gb  ABE79940.1  Aldo/ keto reductase [Medicago truncatula]	
Contig8971		gb  AAL01886.1  chitinase 3-like protein precursor [Trichosanthes kirilowii]	
→ Contig9073		emb  CAA85426.1  catalase [Nicotiana plumbaginifolia]	
Contig9189		No Hit	
Contig9333		gb  ABE83482.1  AAA ATPase, central region; Homeodomain-like [Medicago truncatula]	
Contig9409		dbj  BAA89317.1  23kDa polypep. oxygen-evolving complex of photosystem II [C. sativus]	
Contig9985		gb  ABB29942.1  Sadenosyl methionine synthase-like [Solanum tuberosum]	
Contig10569		emb  CAD11991.1  rubisco small subunit [Coffea arabica]	
→ Contig14431		emb  CAA36380.1  unnamed protein product [Gossypium hirsutum]	
Contig14032		gb  AAC33591.1  putative early light induced protein [Arachis hypogaea]	
Contig14066		ref  NP_199832.1  quinolinate synthetase A [Arabidopsis thaliana]	
Contig14592		gb  AAL01886.1  chitinase 3-like protein precursor [Trichosanthes kirilowii]	
→ Contig14893		gb  ABE83482.1  AAA ATPase, central region; Homeodomain-like [Medicago truncatula]	
→ Contig15182		ref  NP_179721.1  oxidoreductase [Arabidopsis thaliana]	
Contig17834		gb  ABE83482.1  AAA ATPase, central region; Homeodomain-like [Medicago truncatula]	
Contig17964		ref  NP_179721.1  oxidoreductase [Arabidopsis thaliana]	
<b>SH3</b>			
<b>Contig</b>		<b>Melhor Blast Hit</b>	
Contig93		gb  AAQ56195.1  aminotransferase 2 [Cucumis melo]	
→ Contig1671		No Hit	
Contig2617		ref  NP_179721.1  oxidoreductase [Arabidopsis thaliana]	
→ Contig9073		emb  CAA85426.1  catalase [Nicotiana plumbaginifolia]	
Contig9174		emb  CAE05952.3  OS.NBb0088C09.11 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	
Contig9850		emb  CAA88629.1  pre-pro-cysteine proteinase [Lycopersicon esculentum]	
Contig10248		gb  AAA18529.1  chlorophyll A/B binding protein	
Contig10486		gb  ABC59515.1  chloroplast photosystem II 22 kDa component [Nicotiana benthamiana]	
Contig13239		emb  CAD11991.1  rubisco small subunit [Coffea arabica]	
→ Contig14431		emb  CAA36380.1  unnamed protein product [Gossypium hirsutum]	
→ Contig14893		gb  ABE83482.1  AAA ATPase, central region; Homeodomain-like [Medicago truncatula]	
Contig15009		emb  CAB51533.1  galactinol synthase, isoform GalS-1 [Ajuga reptans]	
→ Contig15182		ref  NP_179721.1  oxidoreductase [Arabidopsis thaliana]	
Contig17817		gb  AAC33591.1  putative early light induced protein [Arachis hypogaea]	
Contig17836		gb  AAC33591.1  putative early light induced protein [Arachis hypogaea]	
Contig18205		No Hit	
Contig18219		No Hit	
Contig18250		No Hit	
Contig18335		No Hit	
Contig18452		gb  AAD27882.2  chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor [Vigna radiata]	

#### **5.4 Análise dos resultados de BLASTX dos clusters formados exclusivamente com ESTs de SH2, SH3 e SH2 SH3.**

A tabela 5 apresenta os resultados de BLASTX dos 20 clusters com maior expressão *in silico* e formados exclusivamente com ESTs das bibliotecas SH2 ou SH3. Já a tabela 6, apresenta os resultados de BLASTX correspondente aos clusters formados exclusivamente com ESTs das bibliotecas SH2 e SH3. Todos esses clusters foram identificados por meio da ferramenta de busca de “Biblioteca Específica” disponível na Base de Dados cafEST. Na figura 7 estão apresentados os resultados de expressão relativa *in silico* dos 20 clusters com maiores valores, obtidos da lista de contigs formados exclusivamente com ESTs de SH2 (painel superior) ou SH3 (painel inferior). Importante notar que três dos clusters formados exclusivamente por ESTs da biblioteca SH3 (figura 7) também estão listados na figura 6, indicando que além de serem formados exclusivamente por ESTs desta biblioteca, também figuram entre os 20 clusters com maior expressão *in silico* da biblioteca SH3.

Observando-se os dados apresentados na figura 8, vale a pena ressaltar que os contigs 14838, 15284 e 18002, apresentam uma maior ocorrência de ESTs proveniente da biblioteca SH3 (clone tolerante), quando comparado aos demais clusters formados exclusivamente por ESTs das bibliotecas SH2 e SH3. Na tabela 6, pode-se observar os resultados de BLASTX correspondente a esses contigs e pode-se salientar que o contig 18002, apresenta similaridade com uma catalase. Nota-se também, que dentre os contigs com maior expressão *in silico*, apresentados na figura 8, os contigs 18283, 15208, 18467, 18015 e 15055 são os que apresentam uma maior ocorrência de ESTs proveniente da biblioteca SH2 (estresse hídrico em campo). Dois desses contigs apresentam similaridade com *heat shock proteins*, já caracterizadas em outras espécies vegetais como componentes da resposta ao estresse hídrico.

TABELA 5 Resultados de BLASTX dos 20 clusters com maior expressão *in silico*, formados exclusivamente com ESTs das bibliotecas SH2 (painel superior) e SH3 (painel inferior).

Contig	Melhor Blast Hit
Contig15034	ref  NP_850380.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig15339	No Hit
Contig15293	dbj  BAF13462.1  Os03g0795400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig15255	emb  CAB79380.1  hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]
Contig15225	No Hit
Contig15215	No Hit
Contig15110	gb  AAB03097.1  Hsp22.3
Contig15075	dbj  BAA88921.1  sigma factor [Nicotiana tabacum]
Contig15043	ref  NP_197514.2  binding [Arabidopsis thaliana]
Contig15011	gb  AAU43934.1  unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig14973	ref  YP_532907.1  ABC transporter related [Rhodospseudomonas palustris BtsB18]
Contig14901	No Hit
Contig15275	ref  XP_482757.1  putative elicitor-inducible cytochrome P450 [O.sativa (japonica cv.-group)]
Contig15260	No Hit
Contig15259	No Hit
Contig15251	ref  YP_545679.1  methyl-accepting chemotaxis sensory transducer [Methylobacillus flagellatus KT]
Contig15250	No Hit
Contig15244	gb  AAS49088.1  At2g24395 [Arabidopsis thaliana]
Contig15239	gb  AAU94373.1  At2g36070 [Arabidopsis thaliana]
Contig15229	No Hit
Contig	Melhor Blast Hit
Contig18205	No Hit
Contig17817	gb  AAC33591.1  putative early light induced protein [Arachis hypogaea]
Contig17836	gb  AAC33591.1  putative early light induced protein [Arachis hypogaea]
Contig18035	gb  AAO85557.1  photosystem I subunit XI [Nicotiana attenuata]
Contig18089	gb  AAP85545.1  putative WRKY-type DNA binding protein [Glycine max]
Contig17868	gb  ABE83633.1  Ribosomal protein L10; Ribosomal protein 60S [Medicago truncatula]
Contig18344	gb  AAC24001.1  isoflavone reductase related protein [Pyrus communis]
Contig17875	emb  CAA77213.1  sigma-like factor [Arabidopsis thaliana]
Contig17893	ref  NP_564667.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig17939	No Hit
Contig17960	No Hit
Contig18100	No Hit
Contig18158	gb  AAZ32409.1  S-methyltransferase [Catharanthus roseus]
Contig18251	dbj  BAC77694.1  lipid transfer protein [Atriplex nummularia]
Contig18255	dbj  BAF08985.1  Os02g0543000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig18303	emb  CAB87849.1  receptor kinase-like protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18377	gb  AAF86687.1  MTD1 [Medicago truncatula]
Contig18394	dbj  BAA96917.1  unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]
Contig18404	No Hit
Contig18411	ref  XP_463936.1  putative NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase [O. (japonica cv-group)]

TABELA 6 Resultados de BLASTX dos 36 clusters, formados exclusivamente com ESTs das bibliotecas SH2 e SH3.

SH2 SH3 exc Contig	Melhor Blast Hit
Contig15055	No Hit
Contig15208	emb  CAB79558.1  putative protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18015	gb  AAD41409.1  cytosolic class II low molecular weight heat shock protein [Prunus dulcis]
Contig18283	ref  NP_564334.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18467	emb  CAA44820.1  heat shock protein 70 [Nicotiana tabacum]
Contig14811	dbj  BAA98190.1  regulator of chromosome condensation (cell cycle regulatory protein) like [A. thaliana]
Contig14824	No Hit
Contig14831	gb  ABF00136.1  SNI1 [Solanum tuberosum]
Contig14838	ref  NP_567928.1  carbonate dehydratase/ zinc ion binding [Arabidopsis thaliana]
Contig14857	dbj  BAD87356.1  unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig14907	gb  ABE85888.1  hypothetical protein MtrDRAFT_AC148765g17v1 [Medicago truncatula]
Contig14915	gb  AAS76775.1  At1g34360 [Arabidopsis thaliana]
Contig14951	No Hit
Contig14994	emb  CAB80438.1  bZIP transcription factor-like protein [Arabidopsis thaliana]
Contig15003	ref  NP_193063.2  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig15070	gb  AAM97542.1  catalase 3 [Capsicum annuum]
Contig15078	emb  CAB85519.1  putative protein [Arabidopsis thaliana]
Contig15115	gb  AAM19345.1  hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]
Contig15284	tpel  CA156334.1  TPA: isoflavone reductase-like protein 5 [Vitis vinifera]
Contig15292	emb  CAD10638.1  PBF68 protein [Nicotiana tabacum]
Contig15296	gb  AAS67377.1  CONSTANS 1 [Lycopersicon esculentum]
Contig17829	ref  NP_177561.1  glycerophosphodiester phosphodiesterase [Arabidopsis thaliana]
Contig17887	gb  ABE92607.1  Agenet [Medicago truncatula]
Contig17928	gb  AAC33924.1  phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1 [Lycopersicon esculentum]
Contig17966	dbj  BAF17401.1  Os05g0401200 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Contig17989	ref  NP_192811.3  ATP binding / kinase / serine / threonine kinase / protein-tyrosine kinase [A. thaliana]
Contig18002	emb  CA143948.1  catalase [Populus deltoides]
Contig18007	ref  NP_179688.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18009	No Hit
Contig18080	ref  NP_197460.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18082	ref  NP_565308.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18142	gb  AAT70469.1  At2g46100 [Arabidopsis thaliana]
Contig18165	gb  ABE78360.1  NAD-dependent epimerase/dehydratase [Medicago truncatula]
Contig18249	gb  AAG50930.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]
Contig18252	gb  AAT74541.1  dual-specificity phosphatase protein [Oryza sativa]
Contig18456	gb  AAV59263.1  At5g24670 [Arabidopsis thaliana]

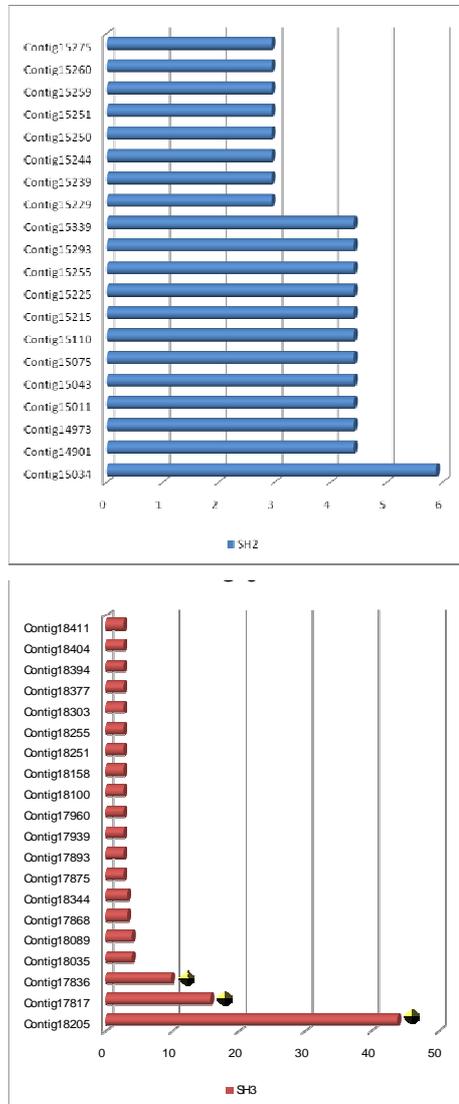


FIGURA 7 Dados de expressão relativa ao cluster mais expresso de cada biblioteca, para os 20 clusters com maior expressão *in silico* formados exclusivamente com ESTs das bibliotecas SH2 (painel superior) e SH3 (painel inferior). As pirâmides ilustram os clusters que também estão entre os 20 contigs com maior expressão *in silico* da biblioteca SH3 (figura 3).

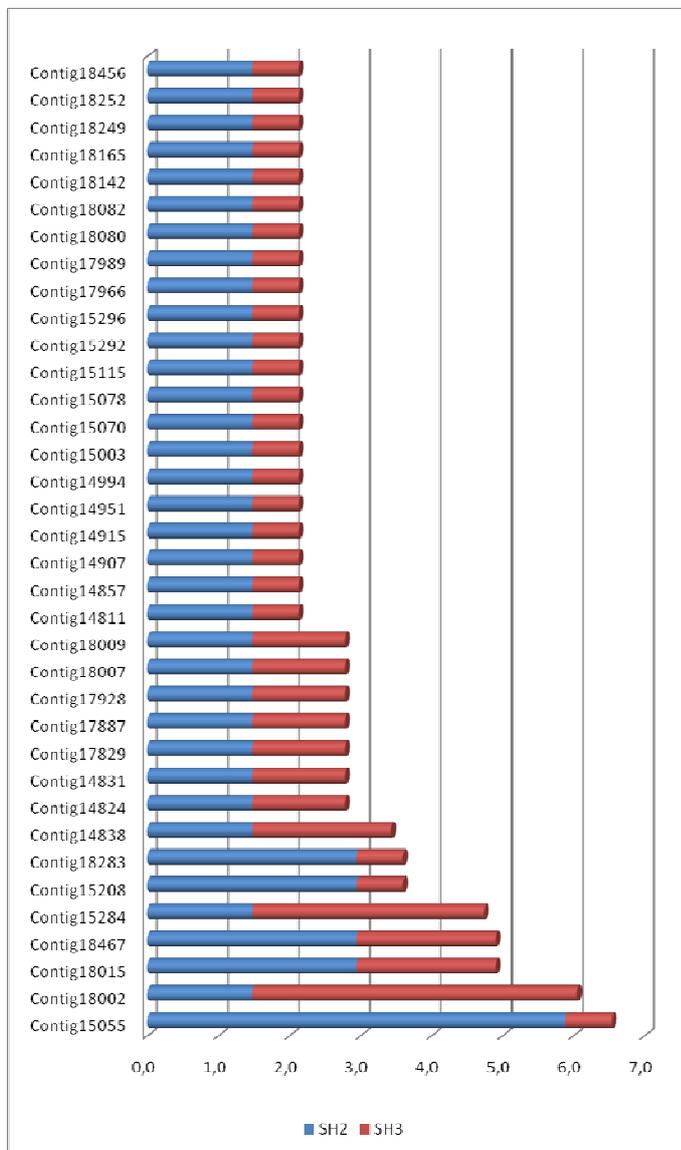


FIGURA 8 Dados de expressão relativa ao cluster mais expresso de cada biblioteca, para os 36 clusters formados exclusivamente com ESTs das bibliotecas SH2 e SH3. A proporção de ocorrência de ESTs de cada biblioteca está ilustrada pelas diferentes cores.

## 6 CONCLUSÃO

A construção da Base de Dados do Genoma Café, com seqüências ESTs, foi de fundamental importância para a identificação de genes com possível envolvimento na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro.

Após a clusterização e análises dos contigs formados, utilizando-se as ferramentas de bioinformática presentes na Base de Dados do Genoma Café, foi possível a identificação de clusters formados especificamente por ESTs provenientes das bibliotecas de cDNA construídas a partir de material vegetal submetido ao estresse hídrico.

Por meio das análises *in silico* apresentadas nesse capítulo foi possível a identificação e seleção de vários genes candidatos à resposta ao estresse hídrico em cafeeiro, tais como genes envolvidos na resposta bioquímica na planta, incluindo acúmulo de osmólitos, detoxificação ou síntese de compostos de proteção e, adaptações fisiológicas que podem elevar a eficiência do uso da água. A identificação e caracterização desses genes possibilita a realização de estudos posteriores de validação e identificação de polimorfismos, para o desenvolvimento de marcadores moleculares associados à tolerância à seca.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 117-124, Apr. 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Projeto Genoma Café**. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/biotec/genomacafe>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

GYÖRGYÉY, J.; VAUBERT, D.; JIMÉNEZ-ZURDO, J. I.; CHARON, C.; TROUSSARD, L.; KONDOROSI, Á.; KONDOROSI, É. *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. **Molecular Plant Microbe Interact**, Saint Paul, v. 13, n. 1, p. 62-71, Jan. 2000.

HANDBERG, K.; STOUGAARD, J. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. **The Plant Journal**, Denmark, v. 2, n. 4, p. 487-496, July 1992.

HOEVEN, R. van der; RONNING, C.; GIOVANNONI, J.; MARTIN, G.; TANKSLEY, S. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 7, p. 1441-1456, July 2002.

MY STRUCTURED QUERY LANGUAGE. **MySQL**. New York, 1995.  
Disponível em: <<http://www.mysql.com/>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic local alignment search tool**. Washington, 1988. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blastcgihelp.shtml>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA JUNIOR, V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. cDNA arrays analysis and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 4, p. 1811-1824, Aug. 2003.

OHLROGGE, J.; BENNINGT, C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 224-228, June 2000.

PERRET, E.; FERRÁN, E. A.; MARINX, O.; LIAUZUN, P.; DUMONT, X.; FOURNIER, J.; KAGHAD, M.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Improved differential screening approach to analyse transcriptional variations in organized cDNA libraries. **Gene**, Paris, v. 208, n. 2, p. 103-115, Feb. 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 2. ed. rev. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 2222 p.

TELLES, G. P.; SILVA, F. R. da. Trimming and clustering sugarcane ESTs. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, n. 1/4, p. 17-23, Jan./Dec. 2001.

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH. **Computational biology and functional genomics laboratory**. Washington, 2001. Disponível em: <<http://sgn.cornell.edu/>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; ARAUJO, A. H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C. A.; MARIN, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. de B.; MONTE, D. C.; GIGLIOTI, É. A.; KIMURA, E. T.; ROMAN, E.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; ALMEIDA, E. R. P.; JORGE, É. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, F. R. da; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; EL DORRY, H.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; LIMA, L. M.; CAMARGO, L. E. A.; PEREIRA, L. F. P.; COUTINHO, L. L.; LEMOS, M. V. F.; ROMAN, M. R.; MACHADO, M. A.; COSTA, M. M. C.; GROSSI-DE-SA, M. F.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; TINCO, M. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; VANSLUYS, M. A.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; EIRA, M. T. S. da; GUERREIRO, F. O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, R. L. B. C. de; HAKAKAVA, R.; FILIPPI, S. B.; TSAI, S. M.; DI MAURO, S. M. Z.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.

VINECKY, F.; BRITO, K. M. de; SILVA, F. R. da; ANDRADE, A. C. Análise *in silico* de genes potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos, presentes na base de dados do Genoma Café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina, PR. **Anais...** Brasília, Embrapa Café, 2005. CD-ROM.

## CAPÍTULO 2

### IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM CAFEIEIRO, POR MEIO DE ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA COM MACROARRANJOS DE cDNA

#### 1 RESUMO

Advinda de regiões africanas, a cultura cafeeira tornou-se amplamente cultivada em todo o mundo e como várias outras culturas, vem sofrendo perdas na produção devido aos crescentes períodos de seca ocorridos nos últimos anos, provavelmente em decorrência das mudanças climáticas globais. Vários estudos em diferentes áreas do conhecimento, tem sido realizados, com o objetivo de se identificar estratégias para que as plantas tenham a capacidade de tolerar condições adversas de estresse hídrico. O desenvolvimento de cultivares melhorados de café que possam suportar períodos prolongados de seca, com rendimentos aceitáveis sob o déficit da água, deve ser uma das prioridades dos programas de melhoramento genético do cafeeiro. No que diz respeito ao café conillon (*Coffea canephora*), os melhoristas do INCAPER têm obtido sucesso na seleção de clones promissores para a tolerância à seca. As avaliações fisiológicas de alguns destes clones, confirmam possíveis características superiores para a tolerância à seca. De maneira integrada com a caracterização fisiológica destes clones de *C. canephora*, estudos voltados para as respostas moleculares podem também auxiliar, na compreensão dos mecanismos de tolerância à seca envolvidos, além de possibilitar o desenvolvimento e uso de ferramentas moleculares para se acelerar o melhoramento genético do cafeeiro. As respostas ao déficit hídrico certamente envolvem mudanças na expressão gênica e o objetivo do presente trabalho foi caracterizar essas alterações utilizando-se a comparação do perfil da expressão gênica de um clone de *C. canephora* sensível (clone 22) e um clone tolerante (clone 14) cultivados sob condições controle e de estresse hídrico. A técnica que foi utilizada neste trabalho foi a hibridização com macroarranjos de DNA, a qual se mostrou eficiente para se identificar genes diferencialmente expressos entre os tratamentos utilizados (irrigado e não irrigado), assim como diferenciais entre os materiais genéticos estudados (clone tolerante x sensível). Esses genes diferencialmente expressos são potenciais candidatos para a tolerância à seca em

cafeeiro e podem ser objeto de estudos experimentais posteriores, visando o desenvolvimento de marcadores moleculares associados a esta característica. Neste estudo, 29 genes foram selecionados para validação em análises da expressão gênica por qPCR.

## CHAPTER 2

### IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR DROUGHT TOLERANCE IN COFFEE WITH GENE EXPRESSION ANALYSIS USING cDNA MACROARRAYS

#### 2 ABSTRACT

Originated from African regions, coffee has become widely cultivated throughout the world and like other crops, has been suffering production losses due to increasing drought periods occurred in recent years, probably due to global climate changes. Several studies in different fields of knowledge have been carried out in order to identify strategies that plants may have to tolerate adverse conditions of water stress. The development of improved varieties of coffee that can withstand prolonged periods of drought, with acceptable yields under water deficit should be among priorities of coffee breeding programs. Regarding coffee conillon (*Coffea canephora*), breeders of INCAPER have achieved success in the selection of promising clones for drought tolerance. The physiological assessment of some of these clones, has confirmed some characteristics for higher tolerance to drought. Integrated molecular analysis aimed at characterizing the molecular response with the physiological characterization of these clones of *C. canephora*, may also help in a better understanding of the mechanisms involved in drought tolerance, and might enable the development and use of molecular tools to accelerate genetic improvement of coffee. Responses to water deficit certainly involve changes in gene expression and the aim of this study was to characterize these changes by comparisons of the gene expression profile of a *C. canephora* sensitive clone (clone 22) and a tolerant clone (clone 14) grown under control and drought stress conditions. The technique used in this study was the hybridization of cDNA macroarrays, which was efficient to identify genes differentially expressed between the treatments used (irrigated and non irrigated) as well as differences between the genotypes studied (clone tolerant x sensitive). These differentially expressed genes are potential candidates for drought tolerance in coffee and may be subject to further experimental studies aiming at the development of molecular markers associated with this trait . In this study, 29

genes were selected for validation experiments by gene expression analysis using qPCR.

### 3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, novas tecnologias aplicadas à análise da expressão gênica, vêm sendo desenvolvidas. Desde as analyses por Northern blotting (Alwine et al., 1977), foram desenvolvidas as técnicas de Dot Blots (Hu et al., 1995), Serial Analysis of Gene Expression – SAGE (Veleulescu et al., 1995), DNA arrays (Brown & Botstein, 1999; Dopazo et al., 2001), RT-PCR (Holland et al., 1991) e mais recentemente Real Time - qPCR (Vitzthum et al., 1999). Entretanto, alguns destes métodos não permitem a análise simultânea de um grande número de genes. Entre a variedade de metodologias atualmente disponíveis para análise de expressão em larga escala, destacam-se o arranjos de DNA (Baldwin et al., 1999) os quais permitem a análise da expressão gênica de uma determinada amostra biológica em escala genômica, ou seja, centenas ou milhares de genes avaliados simultaneamente (Hal et al., 2000; Dopazo et al., 2001). Essas análises fornecem uma observação geral das alterações que ocorrem no transcrito e possibilitam a identificação de possíveis mecanismos de regulação.

Convém ressaltar que existem diversos termos empregados para descrever os arranjos de DNA. O termo microarranjo é utilizado para descrever arranjos em lâminas de vidro tais como DNA microarrays (Schummer et al., 1999; Ichikawa et al., 2000; Kuhn et al., 2001) e arranjos de oligonucleotídeos (Cohen et al., 2000; Li et al., 2001). Já o termo macroarranjo é utilizado para descrever arranjos em membranas de náilon como, por exemplo, *high density membranes* (Zhao et al., 1995; Eckmann et al., 2000), *nylon arrays* (Cox, 2001), *cDNA macroarrays* (Sasaki et al., 2001; Watakabe et al., 2001) e *filter arrays* (Nogueira et al., 2003).

Para a construção de macroarranjos, dependendo do número de clones a serem arranjados e da densidade desejada, a aplicação nas membranas pode ser realizada manualmente ou automaticamente por um robô (Piétu et al., 1996). As sondas complexas de cDNA são preparadas a partir dos mRNAs ou do RNA total, submetidos à transcriptase reversa e marcação radioativa simultânea dos cDNAs resultantes (Bernard et al., 1996). A marcação radioativa é feita com  $^{33}\text{P}$  preferencialmente, pois este radioisótopo permite maior resolução quando se trabalha com membranas de alta densidade (Passos et al., 1999).

A confecção dos arranjos de DNA, é feita em suporte sólido (membranas de náilon ou placas de vidro), onde os DNA-alvos (produtos de PCR, plasmídeos ou bactérias contendo os plasmídeos) são depositados de maneira ordenada (Nguyen et al., 1995). Os arranjos são então hibridizados com uma alíquota de cDNA marcada com fluoróforos ou radioisótopos (sondas de cDNA). Para retirar excesso de sonda dos arranjos é feita uma lavagem, sendo que o sinal detectado após a hibridização é proporcional à concentração de determinado mRNA na população original (Perret et al., 1998).

Os arranjos de DNA são diferenciados por algumas características. Os macroarranjos utilizam membranas de náilon, enquanto que os microarranjos utilizam slides de vidro ou silício. A impressão dos DNA-alvo são feitos com o auxílio da robótica nos microarranjos e pode ser tanto com fragmentos de cDNA como com oligonucleotídeos. Já nos macroarranjos, a impressão pode ser feita manualmente ou também com o auxílio de robôs e em sua confecção podem ser utilizados produtos de PCR, plasmídeos ou ainda bactérias contendo plasmídeos. A marcação da sonda para microarranjo normalmente é feita com fluoróforos (Cy3 e Cy5) e a sonda para o macroarranjo é feita com isótopos radioisótopos de P ( $^{32}\text{P}$  ou  $^{33}\text{P}$ ) (Lashkari et al., 1997).

O desenvolvimento dessas tecnologias aplicadas à biologia e genética molecular vem propiciando uma produção enorme de informações na área

genômica, através, inicialmente do seqüenciamento genômico de diferentes organismos, até a utilização da tecnologia dos arranjos de DNA para se analisar simultaneamente a expressão de vários genes. Desta forma, torna-se possível decifrar o perfil da expressão gênica de determinado organismo, em resposta a uma condição de estresse. Os resultados destas análises em plantas modelo, permitiram revelar a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas dos vegetais aos estresses abióticos (Shinozaki & Dennis, 2003). Esses mecanismos moleculares são baseados na ativação e regulação da expressão de vários genes, cujos produtos protéicos podem estar envolvidos tanto na resposta (percepção, tradução do sinal e controle da expressão gênica/fatores de transcrição) como na tolerância ao estresse (antioxidantes, protetores osmóticos, transporte iônico, etc) (Shinozaki & Dennis, 2003).

Os macroarranjos de DNA se tornaram uma ótima ferramenta de baixo custo, quando comparados aos microarranjos, por possibilitar a visualização de centenas de interações que ocorrem, em âmbito transcricional, em resposta a eventos fisiológicos diversos. Com este conhecimento, é possível delinear estratégias que visem aumentar a tolerância das plantas cultivadas às condições de estresse ambiental. Estratégias que vão desde métodos tradicionais de melhoramento genético, facilitado pelo uso de marcadores moleculares, até o uso da engenharia genética para o desenvolvimento de novas variedades (Nepomuceno et al., 2001).

Neste trabalho, objetivou-se a identificação de genes envolvidos nas respostas do cafeeiro à seca, a partir da construção e análise de macroarranjos de cDNAs advindos das bibliotecas de EST, SH2 e SH3. Após a exclusão de clones redundantes entre as bibliotecas SH2 (*C. arabica*) e SH3 (*C. canephora*), procedeu-se a construção de um conjunto unigene que foi alíquotado nas membranas. Essas membranas foram posteriormente utilizadas em experimentos de hibridização. A análise dos resultados obtidos permitiu a identificação de

vários genes diferencialmente expressos entre os tratamentos utilizados (irrigado e não irrigado), assim como diferenciais entre os materiais genéticos estudados (clone tolerante x sensível). Esses genes diferencialmente expressos são potenciais candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro e podem ser objeto de estudos experimentais posteriores.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Confeção de Membranas de Alta Densidade (Macroarranjos)**

As membranas de alta densidade utilizadas neste trabalho foram confeccionadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com o auxílio de um sistema robotizado QBot (Genetix, Uk). Para o preparo das mesmas foi utilizado produto de PCR de clones das ESTs selecionadas, oriundos das bibliotecas de cDNA, SH2 e SH3, sequenciadas no âmbito do Projeto Genoma Café. As amostras de produtos de PCR foram obtidas em placas de 96 poços e arranjadas em placas de 384 poços, para posterior depósito nas membranas.

Foram transferidas para membranas de náilon carregadas positivamente (Genetix, UK), através de um sistema robotizado QBot (Genetix, Uk), 3378 amostras de DNA (produtos de PCR), sendo 8 placas de 384 poços completas e 1 placa incompleta. Foram depositados também 36 controles positivos presentes em todas as placas totalizando 3.414 “spots” e os pontos ausentes da placa incompleta, funcionaram como controle negativo. Em um arranjo 3X3, as amostras foram depositadas em duplicata para maior confiabilidade das análises, perfazendo um total de 6.828 “spots” por membrana. Em uma mesma membrana (22 x 22 cm) foram aliquotados dois macroarranjos que posteriormente foram separados, sendo que desta forma, foi possível realizar hibridizações de um tratamento e um controle com macroarranjos advindos de uma mesma membrana.

A membrana foi umedecida com uma solução desnaturante (NaCl 0,13 M e 0,5 M NaOH). Após a deposição das amostras de cDNA, a membrana foi colocada em papel filtro molhado com a solução desnaturante por 10 minutos, depois transferida para outro papel de filtro com solução de neutralização (NaCl 1,5 M e Tris 1,0 M) por um período de 5 minutos e posteriormente o cDNA foi fixado à membrana por exposição à luz UV (100  $\mu\text{j}/\text{cm}^2$ ) durante 12 segundos. Depois de seca as membranas foram envolvidas em filme de PVC (poli cloreto de vinila), folha de papel alumínio e assim armazenadas em refrigerador a 4°C até a realização dos experimentos de hibridização.

#### **4.2 Preparo das sondas para hibridização com os macroarranjos**

Para o preparo das sondas, o RNA total dos clones 14 e 22 cultivados em condições (irrigada e não-irrigada) foi extraído utilizando-se o protocolo de extração do reagente Concert® (Invitrogen), conforme descrito no Capítulo 1. Com o RNA purificado a sonda foi marcada com [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dCTP (dideoxicitosina marcada radioativamente com  $^{33}\text{P}$ ) para realização dos experimentos de hibridização.

A marcação das sondas a partir de RNA total, foi realizada conforme descrito a seguir. Para desnaturar o RNA e permitir o anelamento do iniciador oligo-DT, foram submetidos à 75°C por 10 minutos, 10 $\mu\text{g}$  de RNA (6 $\mu\text{l}$ ) e 1,5 $\mu\text{l}$  de oligo-dT (100 $\mu\text{M}$ ). A reação foi centrifugada com um rápido spin e colocada em recipiente com gelo por 5 minutos. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o kit Superscript III (Invitrogen), onde foram adicionados 5 $\mu\text{l}$  de “tampão para a 1ª fita, 2,5 $\mu\text{l}$  de DTT, 1 $\mu\text{l}$  de RNasin, 2,5 $\mu\text{l}$  de mix dNTPs 10 $\mu\text{M}$  (dATP, dGTP e dTTP não marcados) e 5 $\mu\text{l}$  de [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dCTP. Após aquecer a reação por 5min a 42°C foi adicionado 1,5 $\mu\text{l}$  da enzima SuperScript e a reação foi incubada a 42°C por 20min. Após este período e um rápido spin, foi adicionado 1,25 $\mu\text{l}$  dCTP (10 $\mu\text{M}$ ) não-marcado e a reação seguiu por mais 60

min a 42°C. Depois de outro spin a reação foi incubada a 95°C por 5min para desnaturar novamente e foi adicionado 1µl de oligo dA (para diminuição do background) e colocada no gelo por 5min.

#### **4.3 Experimentos de hibridização com os macroarranjos**

As membranas foram pré-hibridizadas por 120 minutos em forno de hibridização a 65°C utilizando-se 50mL da solução de hibridização *Modified Church and Gilbert Buffer* (MCGB) (0,5M Phosphate Buffer pH 7,2, 7%SDS, 10mM EDTA) previamente aquecida à 50°C. Em seguida foram adicionadas aos frascos de hibridização (contendo as membranas e a solução MCGB) as sondas marcadas radioativamente com <sup>33</sup>P. A hibridização foi feita por um período de 16 horas a 65°C. Após este período a solução contendo a sonda foi descartada. Para a lavagem das membranas primeiramente foram adicionados aos frascos 50mL de 1X SSC + 0,1% SDS e colocados de volta ao forno por 10min. A solução foi descartada e esta etapa foi repetida três vezes. Após a terceira lavagem, realizou-se o mesmo procedimento com uma solução mais estrigente (0,1X SSC + 0,1% SDS).

#### **4.4 Aquisição dos dados de macroarranjos**

As membranas foram envolvidas novamente em filme PVC e procedeu-se a exposição dos *Image Plates* (IP). Os dados gerados pelas membranas de macroarranjo, foram adquiridos a partir da leitura dos *Image Plates* (IP) com o auxílio do Phosphoimager FLA3000 (FUJIFILM). Após a hibridização das membranas, estas foram expostas ao IP por 16 horas para a verificação do sinal.. Após essa verificação, a membrana foi exposta novamente ao IP por um período de 72 horas e então, procedeu-se novamente a leitura e os dados adquiridos.

As duas membranas com os 3.414 *spots* hibridizadas com cada clone, uma hibridizada com a sonda do clone de *C. canephora* (irrigado) e a outra com o mesmo clone (não irrigado), foram expostas no mesmo IP (figura 1).

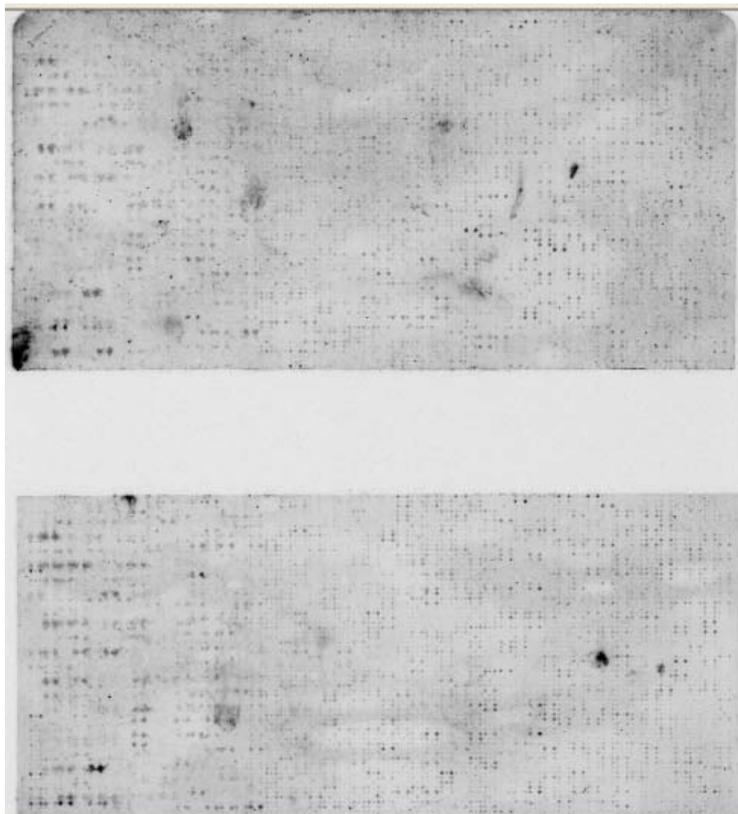


FIGURA 1 Imagem obtida do ArrayGauge para as duas membranas de um clone nas duas condições, irrigada e não irrigada.

#### **4.5 Análise dos dados de macroarranjos**

Para facilitar a comparação entre as imagens obtidas e a identificação dos clones com expressão diferencial, foi feita uma máscara compreendendo todos os clones de cada quadrante da membrana, separadamente (figura 2). Essa

máscara incluiu as repetições dos *spots* e foram determinados os controles positivos (produtos de PCR do vetor de pSPORT).

As imagens digitalizadas foram analisadas usando o software ArrayVision 8.0 (Fujifilm, Tokio), o qual quantifica o valor da intensidade de sinal emitida em cada um dos *spots*. Após a normalização destes valores, pelos controles, foram obtidos os valores líquidos de intensidade emitidos para cada *spot*.

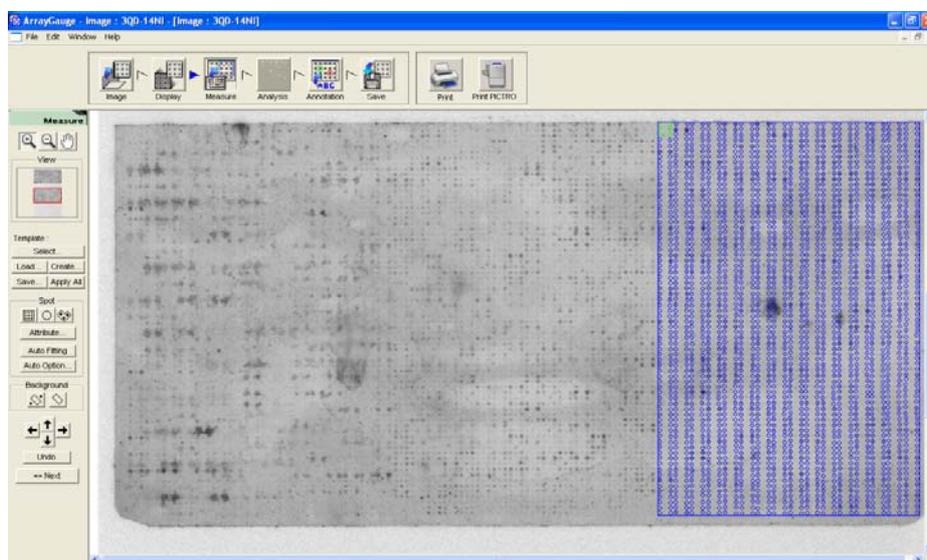


FIGURA 2 Máscara colocada no 3º quadrante da membrana do clone 14 não irrigado.

Inicialmente foram testados os diversos parâmetros disponíveis do programa Array Gauge para a realização das análises. Os melhores resultados os quais apresentaram a menor ocorrência de falsos positivos foram obtidos, quando utilizou-se a obtenção do sinal total, com *background* nulo e normalização com o controle em cada imagem, como parâmetros de análise do programa Array Gauge (Fuji). Entretanto, mesmo com esses parâmetros foi necessário uma inspeção visual dos resultados diferenciais para a eliminação de

falso positivos que normalmente ocorriam em manchas das diferentes imagens das membranas. Uma vez estabelecidas as condições de análise, uma tabela foi gerada com os valores de intensidade de sinal para todos os *spots*, e os clones que mostraram maior diferença entre os tratamentos puderam ser identificados a partir da mudança de coloração, conforme mostrado na figura 3.

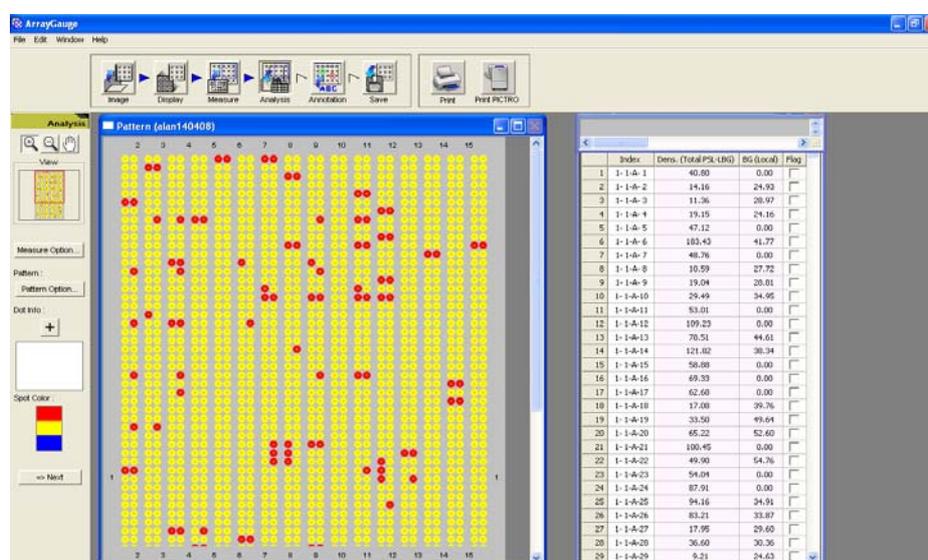


FIGURA 3 Imagem e tabela de valores gerada pelo programa ArrayGauge.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação de parâmetros ideais do software Array Gauge (Fuji) para a realização das análises

Inicialmente, foram gerados gráficos de dispersão com um dos quadrantes da membrana (2°QD) e utilizando-se a comparação dos dados obtidos para o clone 22 irrigado e não irrigado. Essas comparações foram feitas variando-se os parâmetros de análise, disponíveis no programa Array Gauge

(Fuji) (Sinal total x média; Background: nulo, global e local; Normalização: nula, entre imagens – controle x global e controle em cada imagem) e os resultados foram inspecionados visualmente, com o intuito de se avaliar a melhor condição para a realização das análises comparativas. A figura 4 ilustra algumas dessas comparações, indicando uma alta variação nos resultados obtidos em função do parâmetro utilizado na análise dos dados, e com uma alta ocorrência de falsos positivos.

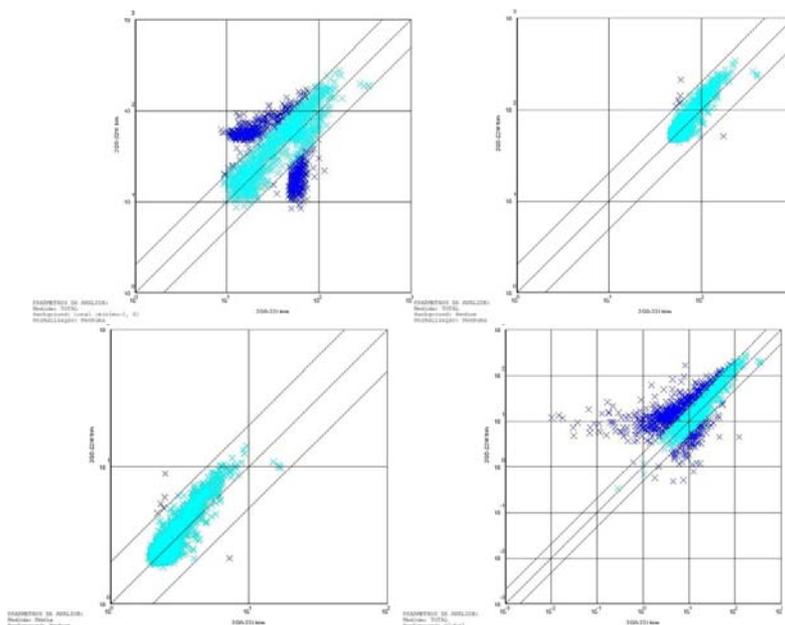
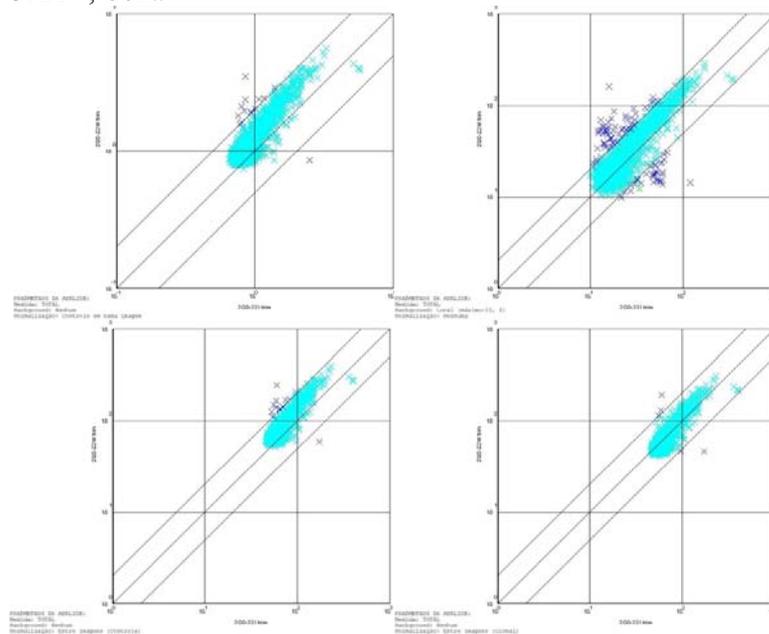


FIGURA 4 Gráficos de dispersão do 2º quadrante com os dados de macroarranjo do clone 22 irrigado e não irrigado, variando-se os parâmetros de análise do software Array Gauge (Fuji). “...continua...”

“FIGURA 4, Cont.”



Após essas análises, verificou-se que os dados que apresentaram a menor ocorrência de falsos positivos, após a inspeção visual, foi quando utilizou-se a obtenção do sinal total, com background nulo e normalização com o controle em cada imagem, como parâmetros de análise do programa Array Gauge (Fuji). Entretanto, mesmo com esses parâmetros foi necessária uma inspeção visual dos resultados diferenciais para a eliminação de falso positivos que normalmente ocorriam em manchas das diferentes imagens das membranas. Com essas condições foram então, realizadas as análises comparativas entre os dados obtidos para os tratamentos clone 22 irrigado *versus* não irrigado (22I x 22NI), clone 14 irrigado *versus* não irrigado (14I x 14NI), clone 22 irrigado *versus* 14

irrigado (22I x 14I) e clone 22 não irrigado *versus* clone 14 não irrigado (22NI x 14NI).

Infelizmente ocorreu um problema durante a confecção da membrana, resultando em dados de baixa qualidade para o primeiro quadrante, após as hibridizações. Desta forma, somente foram analisados os dados obtidos com as análises do 2º e 3º quadrantes da membrana.

## 5.2 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22I x 22NI

Na figura 5 estão apresentados os gráficos de dispersão, obtidos com as análises realizadas com os dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22I x 22NI.

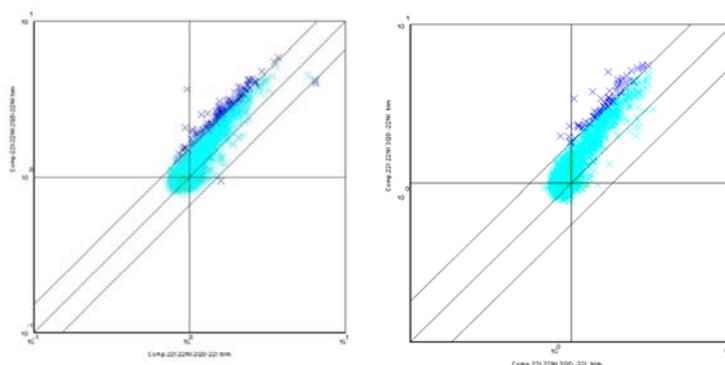


FIGURA 5 Gráficos de dispersão do 2º e 3º quadrantes com os dados de macroarranjo do clone 22 irrigado e não irrigado, utilizando controle entre imagens do software Array Gauge (Fuji).

A dispersão dos dados na figura 5 mostra que foi possível identificar 103 genes (51 e 52, respectivamente, no 2º e 3º quadrantes) com valores de fator diferencial de expressão superior a 1.5 vezes na condição não irrigada do clone 22, para selecionar um número razoável de genes diferenciais.

A tabela 1, apresenta 20 clusters identificados com valores superiores ao fator diferencial de expressão (indicando indução da expressão, no tratamento não irrigado) e 5 clusters com valores inferiores a 0,66 (indicando repressão da expressão, no tratamento não irrigado), após a realização das análises com os dados de macroarranjo dos tratamentos 22I e 22NI, utilizando-se o programa Array Gauge. Foi determinado o número de 20 e 5 clusters para visualização do resultado de BLASTX, apenas por questões de apresentação dos dados.

TABELA 1 Tabela com o resultado de BLASTX, nome do Cluster e o fator diferencial, do 2º e 3º quadrantes com os dados de macroarranjo do clone 22 irrigado e não irrigado.

**22I x 22NI**

Fator	Cluster	BLASTX
3,85	Contig14333	Best Hit: (1e-170) dbj  BAD44492.1  unnamed protein product - <i>Arabidopsis thaliana</i>
3,26	Contig18100	No Hits Found!
2,36	Contig18345	Best Hit: (2e-66) gb  ABB29948.1  vesicle transport v-SNARE 11-like - <i>Solanum tuberosum</i>
2,32	Contig17878	Best Hit: (6e-53) gb  ABI16022.1  Dof21 - <i>Glycine max</i>
2,24	Contig474	Best Hit: (6e-78) ref  NP_850648.1  unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,22	Contig10486	Best Hit: (1e-59) gb  ABC59515.1  chloroplast photosystem II 22 kDa component - <i>Nicotiana benthamiana</i>
2,20	Contig6629	Best Hit: (1e-134) emb  CAA56600.1  36kDA porin II - <i>Solanum tuberosum</i>
2,20	Contig13137	Best Hit: (1e-136) emb  CAJ00009.1  C3HC4 zinc finger containing protein - <i>Medicago truncatula</i>
2,18	SH3-064-C11	No Hits Found!
2,16	Contig18361	Best Hit: (1e-22) gb  AAB65766.1  lipoxygenase
2,13	Contig3981	Best Hit: (4e-56) ref  NP_188894.2  unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,12	SH3-067-H10	No Hits Found!
2,11	SH3-050-D04	No Hits Found!
2,08	Contig10990	Best Hit: (1e-163) gb  AAC28541.1  unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,07	Contig4015	Best Hit: (1e-110) gb  ABA46778.1  unknown - <i>Solanum tuberosum</i>
2,06	Contig17859	Best Hit: (3e-87) emb  CAB87148.1  putative protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,03	Contig17884	Best Hit: (3e-65) gb  AAC33475.1  transcription activator - <i>Pimpinella brachycarpa</i>
2,02	Contig11449	Best Hit: (7e-35) ref  NP_174776.1  DNA binding/ transcription factor - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,02	Contig14081	No Hits Found!
0,61	Contig254	Best Hit: (1e-134) emb  CAA41188.1  chlorophyll a/b binding protein - <i>Nicotiana tabacum</i>
0,61	Contig11332	Best Hit: (4e-51) emb  CAA49693.1  Ntpl10 - <i>Nicotiana tabacum</i>
0,56	Contig12410	Best Hit: (7e-22) dbj  BAA31562.1  metallothionein-like protein - <i>Citrus unshiu</i>
0,52	SH3-039-B09	Best Hit: (3e-14) ref  NP_974382.1  carbohydrate transporter/ sugar porter/ transporter - <i>Arabidopsis thaliana</i>
0,48	Contig8769	Best Hit: (1e-125) gb  ABG73415.1  chloroplast pigment-binding protein CP29 - <i>Nicotiana tabacum</i>

### 5.3 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 14I x 14NI

Na figura 6 estão apresentados os gráficos de dispersão, obtidos com as análises realizadas com os dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 14I x 14NI.

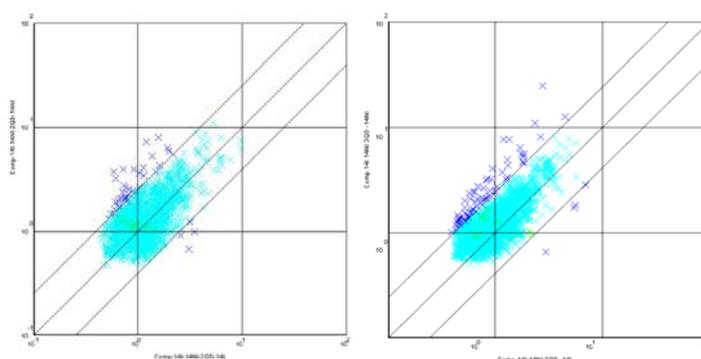


FIGURA 6 Gráficos de dispersão do 2º e 3º quadrantes com os dados de macroarranjo do clone 14 irrigado e não irrigado, utilizando controle entre imagens do software Array Gauge (Fuji).

Na figura 6, a dispersão dos dados mostra que 81 clusters (40 e 41, no 2º e 3º quadrantes, respectivamente) puderam ser identificados com fator diferencial de expressão com valores superiores a 2.5 vezes na condição não irrigada, quando comparada à condição irrigada, do clone 14.

A tabela 2, apresenta 20 clusters identificados com valores superiores de fator diferencial de expressão (indicando indução da expressão, no tratamento não irrigado) e 5 clusters com valores inferiores a 0,4 (indicando repressão da expressão, no tratamento não irrigado), após a realização das análises com os dados de macroarranjo dos tratamentos 14I e 14NI, utilizando-se o programa Array Gauge.

TABELA 2 Tabela com o resultado de BLASTX, nome do Cluster e o fator diferencial, do 2° e 3° quadrantes com os dados de macroarranjo do clone 14 irrigado e não irrigado.

14I x 14 NI

Fator	Cluster	BLASTX
9,00	SH3-074-D10	Best Hit: (4e-58) ref  XP_463936.1  putative NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase - <i>Oryza sativa</i>
6,49	SH3-053-D09	Best Hit: (1e-22) gb  ABC55670.1  dehydrin DH1a - <i>Coffea canephora</i>
6,48	Contig18100	No Hits Found!
6,05	SH3-038-B10	Best Hit: (4e-55) ref  NP_918379.1  putative zinc protease PQQL - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)-
5,50	Contig11894	Best Hit: (3e-35) gb  AAK49535.2  chloroplast protein 12 - <i>Nicotiana tabacum</i>
5,12	Contig18288	No Hits Found!
4,69	Contig12220	Best Hit: (1e-112) gb  ABA96556.1  Sodium Bile acid symporter family protein, expressed - <i>Oryza sativa</i>
4,43	SH3-075-A12	Best Hit: (2e-43) dbj  BAF10321.1  Os02g0799000 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
4,43	SH3-044-C11	Best Hit: (1e-145) dbj  BAB91355.1  beta actin - <i>Triakis scyllium</i>
4,23	SH3-005-C01	No Hits Found!
4,06	Contig17823	No Hits Found!
4,01	Contig17832	Best Hit: (2e-10) gb  ABD28704.1  WD40-like - <i>Medicago truncatula</i>
3,94	Contig11474	Best Hit: (2e-72) gb  ABE86673.1  IMP dehydrogenase/ GMP reductase - <i>Medicago truncatula</i>
3,94	Contig18341	No Hits Found!
3,87	SH3-056-B04	Best Hit: (6e-50) gb  AAM96945.1  small heat shock protein - <i>Lycopersicon esculentum</i>
3,85	Contig12677	Best Hit: (1e-91) gb  ABE92615.1  TRAF-like - <i>Medicago truncatula</i>
3,81	SH3-054-B02	Best Hit: (2e-06) gb  AAG31142.1  EDR1 - <i>Hordeum vulgare</i>
3,80	SH3-069-F05	Best Hit: (1e-67) ref  NP_179721.1  oxidoreductase - <i>Arabidopsis thaliana</i>
3,80	Contig15353	Best Hit: (1e-165) dbj  BAB93004.1  NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase - <i>Nicotiana tabacum</i>
3,67	Contig18310	Best Hit: (2e-61) gb  ABE88499.1  hypothetical protein MtrDRAFT_AC150787g9v1 - <i>Medicago truncatula</i>
0,38	Contig8893	Best Hit: (1e-91) ref  NP_176702.2  unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> - gb  AAN15591.1
0,35	Contig6101	Best Hit: (2e-26) gb  AAY83343.1  non-specific lipid transfer protein precursor - <i>Fragaria x ananassa</i>
0,32	Contig13239	Best Hit: (2e-83) emb  CAD11991.1  rubisco small subunit - <i>Coffea arabica</i>
0,28	Contig18125	No Hits Found!
0,22	Contig2703	No Hits Found!

#### 5.4 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22I x 14I

Na figura 7 estão apresentados os gráficos de dispersão, obtidos com as análises realizadas com os dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22I x 14I.

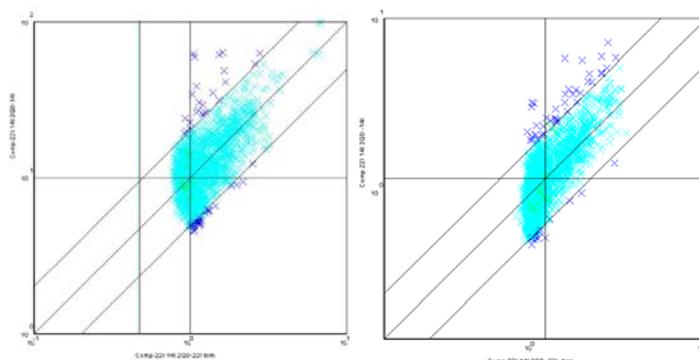


FIGURA 7 Gráficos de dispersão do 2º e 3º quadrantes com os dados de macroarranjo do clone 22 e 14 irrigados, utilizando controle entre imagens do software Array Gauge (Fuji).

Na figura 7, a dispersão dos dados mostra que foi possível identificar 52 clusters (25 e 27, no 2º e 3º quadrantes, respectivamente) apresentando fator de expressão diferencial superiores a 2.0 vezes no clone 14 irrigado quando comparado ao clone 22, nas mesmas condições.

A tabela 3, apresenta 20 clusters identificados com valores superiores de fator diferencial de expressão (indicando indução da expressão, no clone tolerante) e 5 clusters com valores inferiores a 0,5 (indicando repressão da expressão, no clone tolerante), após a realização das análises com os dados de macroarranjo dos tratamentos 22I e 14I, utilizando-se o programa Array Gauge.

TABELA 3 Tabela com o resultado de BLASTX, nome do Cluster e o fator diferencial, do 2º e 3º quadrantes com os dados de macroarranjo dos clones 22 e 14 irrigados.

22I x14I		
Fator	Cluster	BLASTX
5,94	Contig15546	Best Hit: (7e-80) emb  CAA77422.1  ATP-dependent protease proteolytic subunit - <i>Nicotiana tabacum</i>
4,06	Contig18190	No Hits Found!
3,65	S3-074-D10	Best Hit: (4e-58) ref  XP_463936.1  putative NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase - <i>Oryza sativa</i>
3,53	Contig18193	No Hits Found!
3,25	Contig13239	Best Hit: (2e-83) emb  CAD11991.1  rubisco small subunit - <i>Coffea arabica</i>
2,97	Contig18202	Best Hit: (4e-33) dbj  BAF06798.1  Os01g0862600 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
2,89	S3-033-B08	Best Hit: (2e-17) gb  AAS00691.1  metal-nicotianamine transporter YSL1 - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,69	Contig12273	Best Hit: (0) emb  CAA77362.1  acetyl-CoA carboxylase beta subunit - <i>Nicotiana tabacum</i>
2,60	Contig17796	No Hits Found!
2,54	Contig17905	Best Hit: (6e-15) gb  AAS58469.1  ultraviolet-B-repressible protein - <i>Gossypium hirsutum</i>
2,53	Contig18125	No Hits Found!
2,46	Contig12314	Best Hit: (6e-34) ref  NP_973399.1  unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
2,40	S3-047-E05	No Hits Found!
2,39	S3-054-H11	No Hits Found!
2,36	Contig17897	Best Hit: (3e-93) ref  NP_566354.1  SYP71 (SYNTAXIN OF PLANTS71)
2,33	Contig18455	Best Hit: (3e-52) gb  AAU29200.1  glyoxisomal malate dehydrogenase - <i>Lycopersicon esculentum</i>
2,28	Contig9850	Best Hit: (3e-16) emb  CAA88629.1  pre-pro-cysteine proteinase - <i>Lycopersicon esculentum</i>
2,27	Contig15055	No Hits Found!
2,27	Contig12346	Best Hit: (1e-61) gb  ABI18976.1  nuclear-localized RNA binding protein - <i>Capsicum annuum</i>
2,23	S3-011-H05	Best Hit: (9e-25) gb  ABF93810.1  Catalase-1, putative, expressed - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
0,48	Contig18149	Best Hit: (3e-19) emb  CAA41407.1  Type III chlorophyll a / b-binding protein - <i>Pinus sylvestris</i>
0,46	Contig6902	Best Hit: (1e-168) emb  CAB88665.1  tubby-like protein - <i>Ocer arietinum</i>
0,45	Contig12514	Best Hit: (0) emb  CAB82983.1  putative protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
0,45	Contig1110	Best Hit: (1e-104) sp  P35016  ENPL_CATRO Endoplasmic homolog precursor (GRP94 homolog)
0,44	Contig8740	Best Hit: (2e-53) emb  CAA88492.1  TAF-2 - <i>Nicotiana tabacum</i>

### 5.5 Análise comparativa dos dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22NI x 14NI

Na figura 8 estão apresentados os gráficos de dispersão, obtidos com as análises realizadas com os dados de macroarranjos obtidos para os tratamentos 22NI x 14NI.

Ainda na figura 8, a dispersão dos dados mostra que foi possível identificar 52 clusters (47 e 50, no 2º e 3º quadrantes, respectivamente) apresentando fator de expressão diferencial superiores a 2.0 vezes no clone 14 não irrigado, quando comparado ao clone 22, nas mesmas condições.

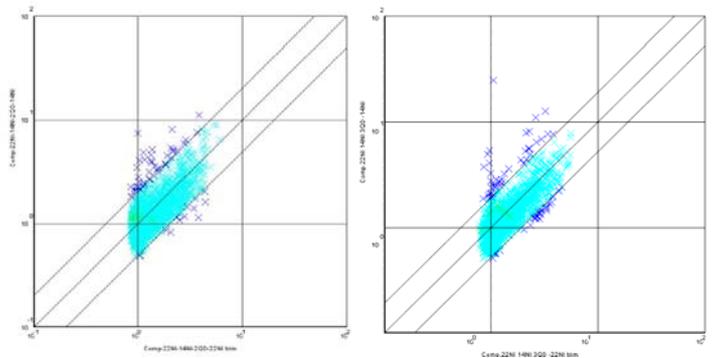


FIGURA 8 Gráficos de dispersão do 2º e 3º quadrantes com os dados de macroarranjo do clone 22 e 14 não irrigados, utilizando controle entre imagens do software Array Gauge (Fuji).

A tabela 4, apresenta 20 clusters identificados com valores superiores de fator diferencial de expressão (indicando indução da expressão, no clone tolerante) e 5 clusters com valores inferiores a 0,5 (indicando repressão da expressão, no clone tolerante), após a realização das análises com os dados de macroarranjo dos tratamentos 22NI e 14NI, utilizando-se o programa Array Gauge.

Tabela 4 Tabela com o resultado de BLASTX, nome do Cluster e o fator diferencial, do 2° e 3° quadrantes com os dados de macroarranjo dos clones 22 e 14 não irrigados.

**22NI x 14NI**

Fator	Cluster	BLASTX
7,59	SH3-038-B10	Best Hit: (4e-55) ref NP_918379.1  putative zinc protease PQQL - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
5,70	SH3-074-D10	Best Hit: (4e-58) ref XP_463936.1  putative NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase - <i>Oryza sativa</i>
5,43	Contig12677	Best Hit: (1e-91) gb ABE92615.1  TRAF-like - <i>Medicago truncatula</i>
4,32	Contig18138	No Hits Found!
4,30	SH3-075-A12	Best Hit: (2e-43) dbj BAF10321.1  Os02g0799000 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)
4,20	Contig12220	Best Hit: (1e-112) gb ABA96556.1  Sodium Bile acid symporter family protein, expressed - <i>Oryza sativa</i>
3,92	SH3-044-C11	Best Hit: (1e-145) dbj BAB91355.1  beta actin - <i>Triakis scyllium</i>
3,88	Contig16287	Best Hit: (0) ref NP_566099.1  ATPbinding/ ATP-dependent helicase/ helicase/ nucleic acid binding-A. <i>thalia</i> .
3,83	Contig18288	No Hits Found!
3,81	Contig15546	Best Hit: (7e-80) emb CAA77422.1  ATP-dependent protease proteolytic subunit - <i>Nicotiana tabacum</i>
3,68	Contig18455	Best Hit: (3e-52) gb AAU29200.1  glyoxisomal malate dehydrogenase - <i>Lycopersicon esculentum</i>
3,64	Contig18310	Best Hit: (2e-61) gb ABE88499.1  hypothetical protein MtrDRAFT_AC150787g9v1 - <i>Medicago truncatula</i>
3,54	Contig10250	Best Hit: (1e-159) emb CAA45701.1  33 kDa polypeptide of water-oxidizing complex of photosystem II-N. <i>tab</i>
3,28	Contig11474	Best Hit: (2e-72) gb ABE86673.1  IMP dehydrogenase/ GMP reductase - <i>Medicago truncatula</i>
3,00	Contig12273	Best Hit: (0) emb CAA77362.1  acetyl-CoA carboxylase beta subunit - <i>Nicotiana tabacum</i>
2,91	Contig15055	No Hits Found!
2,79	Contig17823	No Hits Found!
2,77	SH3-054-B02	Best Hit: (2e-06) gb AAG31142.1  EDR1 - <i>Hordeum vulgare</i>
2,67	Contig18232	Best Hit: (3e-51) ref NP_918379.1  putative zinc protease PQQL - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)-
2,62	SH3-056-B04	Best Hit: (6e-50) gb AAM96945.1  small heat shock protein - <i>Lycopersicon esculentum</i>
0,43	Contig17884	Best Hit: (3e-65) gb AAC33475.1  transcription activator - <i>Pimpinella brachycarpa</i>
0,42	Contig13176	Best Hit: (1e-134) emb CAH67747.1  H0702G05.6 - <i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)-
0,40	Contig1059	Best Hit: (2e-78) ref NP_174607.1  unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i>
0,36	Contig10037	Best Hit: (6e-86) emb CAC34420.1  tropinone reductase I - <i>Solanum tuberosum</i>
0,30	Contig14333	Best Hit: (1e-170) dbj BAD44492.1  unnamed protein product - <i>Arabidopsis thaliana</i>

### 5.6 Análise comparativa global dos dados de macroarranjos

Analisando-se os dados obtidos com todas as comparações realizadas, (22I x 22NI, 14 I x 14 NI, 22 I x 14 I e 22NI x 14NI), pode-se observar que vários clusters foram identificados em mais de uma comparação.

Quando se comparam os dados da tabela 1 com os dados listados na tabela 2, observa-se que o contig 18100 aparece nas duas tabelas, indicando que esse gene pode estar envolvido numa resposta comum ao estresse hídrico tanto no clone 14 (tolerante) como no clone 22 (sensível). Note-se, entretanto que o fator diferencial de expressão é maior na resposta ao estresse hídrico do clone tolerante. Vale ressaltar também, que o cluster 18100 também foi identificado

nas análises *in silico*, descritas no capítulo 1, como sendo formado exclusivamente por ESTs da biblioteca SH3 (*C. canephora*).

Já a comparação dos dados da tabela 1 com os dados da tabela 4, possibilita verificar que os contigs 14333 e 17884, também são comuns às duas tabelas. Neste caso, esses dois contigs aparecem com expressão mais elevada na condição de estresse hídrico do clone 22 e são também diferenciais na comparação da resposta ao estresse hídrico entre os dois clones, porém são reprimidos no caso do clone tolerante.

A análise dos dados apresentados na tabela 2, quando comparados aos dados apresentados na tabela 4, mostra que vários clusters são comuns às duas tabelas (SH3-074-D10, SH3-038-B10, Contig18288, Contig12220, SH3-075-A12, SH3-044-C11, Contig17823, Contig11474, SH3-056-B04, Contig12677, SH3-054-B02 e Contig18310). Isto indica que além de apresentarem expressão diferencial na comparação entre a condição de irrigado e não irrigado do clone 14 (tolerante), esta expressão é diferencial e superior neste clone quando comparado à resposta ao estresse hídrico do clone sensível.

Já a comparação dos dados da tabela 3 com os dados da tabela 4, também apresenta em comum os clusters, Contig15546, SH3-074-D10, Contig12273, Contig18455 e Contig15055. Esses clusters são diferenciais na expressão do clone 14 na condição irrigada, mas também apresentam valores superiores e diferenciais quando da comparação da resposta ao estresse hídrico entre os clones.

Finalmente, uma comparação entre os dados da tabela 2 com os dados apresentados na tabela 3, mostra que os clusters, Contig13239 e Contig18125 apresentam dados de expressão inferior na condição de estresse hídrico do clone 14, porém a expressão desses dois clusters é superior quando se comparam os dados de expressão dos clones sensível e tolerante, na condição irrigada.

Em linhas gerais, esses dados podem indicar diferenças no estado fisiológico dos dois clones, nas mesmas condições de regime hídrico e são também, potenciais candidatos para se explicar as diferenças de tolerância ao estresse hídrico observada entre esses dois materiais genéticos.

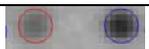
### 5.7 Seleção de genes candidatos para a realização de experimentos de validação por qPCR

Com base nos resultados obtidos nas análises anteriores 28 clusters foram selecionados para análises posteriores por PCR quantitativo (para o Contig 17550 foram desenhados 2 pares de primer, totalizando 29 pares de primers). A figura 9 apresenta a imagem dos “spots” correspondentes a cada um dos genes selecionados, em todas as condições testadas.

Cluster	14I	14NI	22I	22NI
Contig2236				
Contig5409				
Contig11443				
Contig11894				
Contig 12677				
Contig 17550				
Contig17796				
Contig17896				
Contig18100				
Contig18175				

FIGURA 9 Análise visual dos *spots* da membrana de macroarranjo, selecionados como diferenciais. “...continua...”

“FIGURA 9, Cont.”

Contig18310				
Contig18336				
Contig18345				
Contig18353				
Contig18376				
Contig18390				
Contig18455				
SH3-033-B08				
SH3-038-B10				
SH3-053-D09				
SH3-054-B02				
SH3-055-G11				
SH3-056-B04				
SH3-058-H04				
SH3-060-G02				
SH3-069-F05				
SH3-074-D10				
SH3-075-A12				

Estão presentes na membrana diferentes clones em que os seus respectivos Clusters codificam para a enzima Oxireductase. Dentre estes, o Contig 2236 e o Singlet SH3-069-F05 apresentaram expressão diferencial

apenas no clone tolerante, com maior sinal na condição não irrigada. Já o Contig 18353 e o Singlet SH3-060-G02 mostraram expressão em ambos os clones e também na condição estressada (figura 9).

De acordo com a literatura, vários trabalhos mostram que a proteína Prephenate dehydrogenase, é amplamente estudada e a elevada expressão do gene que a codifica, confere às plantas a tolerância ao estresse hídrico (Rippert & Matringe, 2002; Rippert et al., 2004). Nos *spots* com o Contig 17550 representando esse gene, pode-se notar maior expressão no clone tolerante não irrigado, e a quase total ausência de sinal na condição irrigada assim como no clone sensível (figura 9).

A imagem de macroarranjo do Contig 17796, apresentado na figura 9, indica um sinal mais elevado de expressão no clone tolerante. E o Contig 11443 mostra o nível de expressão mais elevado na condição não irrigada (figura 9). Os resultados de BLASTX para as seqüências dos Contigs 11443 e 17796, indicam nenhuma similaridade com seqüências da base de dados mundial (No Hits).

Visto que a tolerância das plantas aos estresses abióticos, é amplamente estudada e com inúmeros genes identificados e caracterizados em várias espécies vegetais, encontrar a expressão diferencial destes genes nas membranas de macroarranjo foi de fundamental importância para comprovação da eficiência dos experimentos realizados neste trabalho. Existem genes e rotas responsivas ao estresse que ainda não foram identificadas ou estudadas. A expressão do “No Hit”, representado pelo Contig18100, muito maior na condição não irrigada, e de outro “No Hit”, o Contig17796 apenas no clone tolerante, indica que existem genes ainda desconhecidos, que respondem ao estresse (figura 9). Estes são genes nunca antes descritos e mostram uma resposta muito expressiva na condição de estresse hídrico ou no clone tolerante. Estudos mais aprofundados podem ser feitos para caracterizá-los funcionalmente, a fim de se conhecer um

pouco mais acerca da associação desses genes com o mecanismo de tolerância à seca.

Apesar do sinal homogêneo no clone tolerante, o Contig18336, que representa um o gene da “putative early light induced protein”, é levemente mais expresso em condições de estresse abiótico do clone sensível (figura 9).

A resposta da planta às condições ambientais variadas, pode ocorrer de diferentes formas. Existem sinalizadores, receptores de sinal, fatores de transcrição entre outras organelas e sinalizadores, as proteínas SNARE (vesicle transport v-SNARE 11-like) são proteínas que estão inseridas na membrana onde recebem e transmitem os sinais, sob condição de estresse (Surpin et al., 2003). Os dados apresentados, na figura 9, permitem visualizar que o Contig 18345, representante do gene de café que codifica uma proteína com similaridade às proteínas SNARE, apresentam o sinal elevado na condição estressada, em ambos clones de *C. canephora* estudados.

Codificantes da enzima “NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase”, o Contig18376 e o Singlet SH3-074-D10, apresentaram resultados , com a expressão do gene maior, na condição de estresse hídrico (figura 9).

Proteínas de café similares às dehidrinas estão codificadas no Contig18390 e no Singlet SH3-053-D09. A expressão (figura 9) destes foi visualizada na condição não irrigada. Este gene já foi identificado e descrito em *C. canephora*, porém o seu envolvimento funcional nas respostas ao estresse hídrico só foi descrita em outras espécies vegetais.

O Singlet SH3-033-B08 codifica a proteína “metal-nicotianamine transporter YSL1”. Em plantas, realizam ajuste osmótico (abaixando o potencial de solutos através de acúmulo de íons no vacúolo e a síntese de solutos compatíveis no citosol). Esta proteína realiza também a manutenção da homeostase-iônica intracelular, através da manutenção de alta relação K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> citosólicos, seqüestro de íons tóxicos para o vacúolo ou extrusão celular. A

expressão do gene de café (SH3-033-B08 ) similar ao transportador YSL1 gene foi maior na condição irrigada (figura 9).

A expressão do potencial homólogo de café do gene ERD1, representado pelo Singlet SH3-054-B02 é maior na condição de estresse hídrico (figura 9). Segundo Kim et al. (2003) ocorre acúmulo de mRNA de EDR1 sob ferimentos de plantas, em caso de seca e sob alta concentração de sal. Assim, a resposta a vários estresses é regulada pela sinalização das vias que podem ser interligadas a vários fatores genéticos. O gene EDR1 pode atuar sinalizando rotas para a planta responder ao estresse.

O choque térmico (heat shock-SH) é um sistema conservado de resposta celular para o mecanismo de defesa, que é ativado por uma variedade de estímulos tais como temperatura elevada e um número de componentes químicos. É caracterizada por uma rápida reprogramação da expressão gênica, levando ao acúmulo de proteínas de choque térmico (HSPs), a maioria das quais atuam como chaperonas, protegendo algumas moléculas da planta (Morimoto, 1998; Schöffl et al., 1998). A provável proteína homóloga de café da “small heat shock protein” é codificada pelo Singlet SH3-056-B04, e foi notado (figura 9) uma maior expressão na condição de estresse hídrico, confirmando dados de literatura.

Outros clones foram selecionados de acordo com a expressão diferencial visualizada nas membranas mesmo sem a existência de relatos dos mesmos na literatura. O Contig11894 (“chloroplast protein 12”) e o Contig18175 (“chloroplast FtsH protease”), apresentaram a maior expressão somente na condição não irrigada do clone tolerante (figura 9).

O Contig18310 representa uma proteína hipotética (MtrDRAFT), e o Singlet SH3-058-H04 tem o seu BLASTX representado por F12A21.29 que pode ter função de uma kinase, porém sem função definida. Entretanto, ambas proteínas, podem ter suas funções desvendadas e assim auxiliar ainda mais no

entendimento da resposta das plantas ao déficit hídrico, pois a expressão destes apresentou-se elevada na condição de estresse hídrico do clone tolerante.

A expressão do potencial homólogo de café que codifica uma “putative zinc protease” PQQL, representado pelo Singlet SH3-038-B10 apresenta-se como pode ser visualizado na figura 9, com maior expressão na condição de estresse hídrico e, especificamente no clone tolerante. O mesmo pode ser observado para o Singlet SH3-075-A12, que codifica uma possível proteína, phosphatase 2C.

Com relação ao Contig 18455, o qual pode codificar uma proteína similar à proteína glyoxisomal malate dehydrogenase, pode-se observar, que a expressão deste gene encontra-se um pouco mais elevada na condição irrigada, porém aparece em ambos os clones e nas duas condições (figura 9).

A catalase é uma enzima sempre utilizada pela planta para atuar contra o estresse oxidativo. Ela pode atuar detoxificando peróxido de hidrogênio e também no ciclo fotossintético retirando espécies reativas de oxigênio. Desta forma ela pode ser expressa tanto em condições normais como em situações de estresse. Conforme pode-se observar na figura 9, o Singlet SH3-055-G11, que potencialmente codifica esta proteína, é expresso nas duas condições, porém um pouco mais expressa na condição de estresse e mais acentuada no clone tolerante.

O Contig5409, o qual codifica uma proteína similar a um fator de iniciação 5A2, e o Contig 12677 que codifica uma proteína similar ao TRAF-like, apresentaram a expressão em ambas as condições, porém somente no clone tolerante ao estresse hídrico.

As análises de todos os *spots* e a verificação destes com os relatos na literatura, apresentaram um resultado muito significativo, indicando sucesso nos experimentos de macroarranjos, visto que existem genes que somente aparecem

em condições de estresse hídrico, corroborando dados de literatura e ainda outros, que são expressos apenas no clone tolerante.

## 6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com as análises das hibridizações das membranas de macroarranjo, realizadas com sondas sintetizadas com RNA dos Clones 14 e 22 de *C. canephora*, cultivados em condições controle e sem irrigação, possibilitou a identificação de vários genes com expressão diferencial entre os clones e também, entre os tratamentos.

Alguns dos genes identificados nos experimentos com macroarranjos, também foram identificados previamente nas análises *in silico*, descritas no capítulo 1 desta dissertação..

Vários genes identificados nos experimentos de macroarranjos realizados neste estudo, já haviam sido descritos na literatura, com envolvidos na resposta ao estresse hídrico em outras espécies vegetais, indicando sucesso experimental nos experimentos descritos neste trabalho.

Os experimentos de hibridização de macroarranjos, descritos nesse capítulo, possibilitou também, a identificação de vários novos genes com expressão diferencial, nunca antes descritos (*no hits*), abrindo novas possibilidades experimentais para a caracterização funcional destes genes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Biochemistry**, New York, v. 74, n. 12, p. 5350-5354, Dec. 1977.

BALDWIN, D.; CRANET, V.; RICET, D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 96-103, Apr. 1999.

BERNARD, K.; AUPHAN, N.; GRANJEAUD, S.; VICTORERO, G.; SCHMITT-VERHULST, A. M.; JORDAN, B. R.; NGUYEN, C. Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1435-1442, Apr. 1996.

BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nature Genetics**, New York, v. 21, n. 1, p. 33-37, Jan. 1999.

COHEN, P.; BOUABOULA, M.; BELLIS, M.; BARON, V.; JBILO, O.; POINOT-CHAZEL, C.; GALIÈGUE, S.; HADIBI, E. H.; CASELLAS, P. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 15, p. 11181-11190, Apr. 2000.

COX, J. M. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 250, n. 1/2, p. 3-13, Apr. 2001.

DOPAZO, J.; ZANDERS, E.; DRAGONI, I.; AMPHLETT, G.; FALCIANIC, F. Methods and approaches in the analysis of gene expression data. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 250, n. 1/2, p. 93-112, Apr. 2001.

ECKMANN, L.; SMITH, J. R.; HOUSLEY, M. P.; DWINELL, M. B.; KAGNOFF, M. F. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 19, p. 14084-14094, May 2000.

HAL, N. L. van; VORST, O.; HOUWELINGEN, A. M. van; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; TUNEN, A. J. van; KEIJER, J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 78, n. 3, p. 271-280, Mar. 2000.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, Aug. 1991.

HU, J. S.; LI, H. P.; BARRY, K.; WANG, M. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. **Plant Disease**, Quebec, v. 79, n. 9, p. 902-906, Sept. 1995.

ICHIKAWA, J. K.; NORRIS, A.; BANGERA, M. G.; GEISS, G. K.; WOUT, A. B. van't; BUMGARNER, R. E.; LORY, S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 17, p. 9659-9664, Aug. 2000.

KIM, J. A.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; HAN, K. S.; KIM, K. N.; YUN, C. H.; HEU, S.; PARK, S. Y.; LEE, Y. H.; JWA, N. S. Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 300, n. 4, p. 868-876, Jan. 2003.

KUHN, K. M.; DERISI, J. L.; BROWN, P. O.; SARNOW, P. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. **Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 21, n. 3, p. 916-927, Feb. 2001.

LASHKARI, D. A.; DERISI, J. L.; MCCUSKER, J. H.; NAMATH, A. F.; GENTILE, C.; HWANG, S. Y.; BROWN, P. O.; DAVIS, R. W. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 24, p. 13057-13062, Nov. 1997.

- LI, S.; ROSS, D. T.; KADIN, M. E.; BROWN, P. O.; WASIK, M. A. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 158, n. 4, p. 1231-1237, Apr. 2001.
- MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 24, p. 3788-3796, Dec. 1998.
- NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 23, p. 12-18, nov./dez. 2001.
- NGUYEN, C.; ROCHA, D.; GRANJEAUD, S.; BALDIT, M.; BERNARD, K.; NAQUET, P.; JORDAN, B. R. Differential gene expression in the *Murine thymus* assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. **Genomics**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 207-216, Sept. 1995.
- NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA JUNIOR, V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. cDNA arrays analysis and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 4, p. 1811-1824, Aug. 2003.
- PASSOS, G. A.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto transcriptoma: análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 8, p. 34-37, jan. 1999.
- PERRET, E.; FERRÁN, E. A.; MARINX, O.; LIAUZUN, P.; DUMONT, X.; FOURNIER, J.; KAGHAD, M.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Improved differential screening approach to analyse transcriptional variations in organized cDNA libraries. **Gene**, Paris, v. 208, n. 2, p. 103-115, Feb. 1998.
- PIÉTU, G.; ALIBERT, O.; GUICHARD, V.; LAMY, B.; BOIS, F.; LEROY, E.; MARIAGE-SAMPSON, R.; HOULGATTE, R.; SOULARUE, P.; AUFRAY, C. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. **Genome Research**, Paris, v. 6, n. 6, p. 492-503, June 1996.

RIPPERT, P.; MATRINGE, M. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, Paris, v. 269, n. 19, p. 4753-4761, Oct. 2002.

RIPPERT, P.; SCIMEMI, C.; DUBALD, M.; MATRINGE, M. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, n. 1, p. 92-100, Jan. 2004.

SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, K.; AMAGAI, M.; KUWATA, C.; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H.; TABATA, S. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 153-161, Aug. 2001.

SCHÖFFL, F.; PRÄNDL, R.; REINDL, A. Regulation of the heat-shock response. **Plant Physiology**, Washington, v. 118, n. 4, p. 1135-1141, Dec. 1998.

SCHUMMER, M.; NG, W. V.; BUMGARNER, R. E.; NELSON, P. S.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D. W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R. L.; KARLAN, B. Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Amsterdam, v. 238, n. 2, p. 375-385, Oct. 1999.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E. S. Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 405-409, Oct. 2003.

SOUZA, G. M.; SILVA, A. M. S. Desvendando as vias de transdução de sinal da cana-de-açúcar. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 25, p. 58-63, jun. 2002.

SURPIN, M.; ZHENG, H.; MORITA, M. T.; SAITO, C.; AVILA, E.; BLAKESLEE, J. J.; BANDYOPADHYAY, A.; KOVALEVA, V.; CARTER, D.; MURPHY, A.; TASAKA, M.; RAIKHEL, N. The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2885-2899, Dec. 2003.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression science. **The Scholarly Journal Archive**, New York, v. 270, n. 5235, p. 484-487, Oct. 1995.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 276, n. 1, p. 59-64, Dec. 1999.

WATAKABE, A.; SUGAI, T.; NAKAYA, N.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; YAMAMORI, T.; NAWA, H. Similarity and variation in gene expression among human cerebral cortical subregions revealed by DNA macroarrays: technical consideration of RNA expression profiling from postmortem samples. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 88, n. 1/2, p. 74-82, Mar. 2001.

ZHAO, N.; HASHIDA, H.; TAKAHASHI, N.; MISUMI, Y.; SAKAKI, Y. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. **Gene**, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 207-213, Apr. 1995.

## **CAPÍTULO 3**

### **ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR) DE GENES CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM CAFEIEIRO**

#### **1 RESUMO**

O café é uma das principais commodities agrícolas do mundo e de grande importância econômica para a agricultura brasileira. A cafeicultura é explorada em diferentes regiões do país, com maior importância para o estado de Minas Gerais que é o estado maior produtor de café do país. As condições climáticas adversas observadas em 2007 no estado de Minas Gerais, que se caracterizaram pela escassez de chuvas e temperaturas elevadas, principalmente nas fases de floração e enchimento de grãos, fizeram com que a produção de café no estado ficasse aquém do potencial produtivo das lavouras. De modo geral, seca e temperaturas desfavoráveis são as principais limitações climáticas à produção do cafeeiro. A importância de tais limitações deve aumentar, em função das mudanças reconhecidas no clima global e, também, porque a cafeicultura vem sendo expandida para regiões marginais onde a baixa pluviosidade e temperaturas desfavoráveis se constituem grandes limitações à produção do café. Estresses abióticos como a baixa temperatura ou a seca, são responsáveis pela indução de diversas respostas fisiológicas e moleculares nas plantas. Estas incluem alterações da expressão gênica, visando atingir ajuste osmótico, a indução de reparadores de sistemas moleculares e a expressão de diversas proteínas protetoras. Existem diversas formas de se avaliar a expressão gênica em plantas submetidas ao estresse hídrico. Uma técnica amplamente utilizada nos últimos anos, para a análise quantitativa da expressão gênica é a de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão gênica de 29 genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro, pré-selecionados em estudos de macroarranjos de cDNA. Em sua maioria, os resultados obtidos com as análises de qPCR corroboraram com a expressão diferencial previamente observada nos experimentos com macroarranjos.

## **CHAPTER 3**

### **GENE EXPRESSION ANALYSIS BY QUANTITATIVE REAL TIME PCR (QPCR) OF CANDIDATE GENES FOR DROUGHT TOLERANCE IN COFFEE**

#### **2 ABSTRACT**

Coffee is a major agricultural commodity worldwide and of great economic importance to the Brazilian agriculture. Coffee is cultivated at different regions of the country, with the greatest importance to the Minas Gerais State, which is the largest coffee producer in the country. Adverse weather conditions observed in 2007 in the State of Minas Gerais, characterized by scarcity of rainfall and high temperatures, especially during flowering and grain development, resulted in coffee production below the yield potential of the crops. Usually, prolonged drought periods and adverse temperatures are the main weather constraints to coffee production. The importance of such limitations should increase, according to the recognized changes in global climate, and also because coffee is being expanded to marginal regions where low rainfall and unfavorable temperatures are major limitations to coffee production. Abiotic stresses such as low temperature or drought, are responsible for induction of various physiological and molecular responses in plants. These include changes in gene expression, in order to achieve osmotic adjustment, the induction of repair systems and molecular expression of various protective proteins. There are several ways to evaluate the gene expression in plants subjected to water stress. A widely used technique in recent years for the quantitative analysis of gene expression is the real-time quantitative PCR (qPCR). The objective of this study was to analyze the expression of 29 candidate genes for drought tolerance in coffee, pre-selected in microarrays studies. Most of the results obtained with the qPCR analysis, corroborated with the differential expression previously observed with the microarrays experiments.

### 3 INTRODUÇÃO

A tolerância das plantas à seca demanda características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de arquitetura para que possam suplantar as condições de limitação de água. Caracteres morfológicos, tais como a raiz, a arquitetura ou forma foliar, respostas bioquímicas na planta, incluindo acúmulo de osmólitos, detoxificação ou síntese de compostos de proteção e adaptações fisiológicas que podem elevar a eficiência do uso da água, todos eles contribuem a tolerância à seca dos vegetais. A adaptação à seca pode também envolver mudanças na expressão gênica. Em experimentos com plantas submetidas à estresses osmóticos, realizados com *Arabidopsis thaliana*, mostrou um grande número de genes que são diferencialmente expressos, englobando cerca de 12% do transcriptoma total dessa planta (Kreps et al., 2002). Estes genes são associados e participam na regulação de inúmeras funções celulares, o que reflete a complexidade na adaptação à resposta ao estresse hídrico. A expressão de genes com resposta à seca parece ser bastante conservada nas diferentes espécies vegetais. Por exemplo, entre *A. thaliana* e arroz (Rabbani et al., 2003), os genes associados à comunicação e sinalização celular, ajuste osmótico e detoxificação, exercem funções que aparentemente desempenham papéis fundamentais na adaptação à seca.

Estresses abióticos como a baixa temperatura ou a seca, são responsáveis pela indução de diversas respostas fisiológicas e moleculares nas plantas. Estas incluem alterações da expressão gênica, ajuste osmótico, a indução de reparadores de sistemas celulares em nível molecular, além da expressão das proteínas “late embryogenesis abundant” (LEA) (Ingram & Bartels, 1996; Thomashow, 1999). Estes processos influenciam na distribuição e sobrevivência das plantas e inclusive, na produtividade, em todo o mundo.

Proteínas LEA foram isoladas sob condições de estresse que resultaram na desidratação celular, e assim classificadas em vários grupos (Allagulova et al., 2003). As desidrinas pertencem ao grupo II (Close, 1997) das proteínas LEA. Essa é uma das mais abundantes proteínas vegetais produzidas durante a embriogênese tardia ou em resposta à seca, a baixa temperatura, salinidade ou na presença de altos níveis de ABA (Close, 1996). Dehidrinas foram encontradas em várias espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis*, trigo, cevada, e arroz (Close, 1997), e são componentes da maioria das respostas ao ácido abscísico e proteínas de regulação expressas em baixas temperaturas (Nylander et al., 2001). As proteínas do grupo LEA e as chaperonas estão envolvidas também na manutenção da estrutura de outras proteínas (Zhu, 2001). Todos esses componentes podem também desempenhar a função de proteção dos tecidos vegetais contra danos celulares, como os causados pelo estresse oxidativo (Bray, 1993; Close, 1996; Koag et al., 2003), embora a exata função permanece incerta por ser um grupo enorme de proteínas.

A enzima Prephenate desidrogenase está presente na via metabólica onde serão formados compostos aromáticos como a tirosina e a fenilalanina, as quais são precursores de Vitamina E (tocoferol) que possui a função de proteger membranas biológicas contra o estresse oxidativo (Rippert & Matringe, 2002; Rippert et al., 2004).

Na maioria dos ambientes em que as plantas estão submetidas ao estresse hídrico, a radiação solar é de alta incidência. Apesar da luz ser essencial para as plantas, pois por meio dela realiza-se a fotossíntese e conseqüentemente a assimilação carbono, quando a absorção de luz é excedida além da capacidade fotossintética, são geradas espécies de O<sub>2</sub> reativos nos cloroplastos, causando danos oxidativos nas proteínas, lipídios e nos pigmentos fotossintéticos (Nylogi, 1999). Este efeito é amplificado pelo ambiente no qual a planta está exposta, tais

como baixa temperatura ou a seca, por exemplo, inibindo assim a atividade fotossintética e levando à forte redução no rendimento das culturas.

Em plantas que possuem coloração verde, a energia solar é recolhida pela clorofila e os carotenóides vinculados aos complexos foto-assimiladores (*lightharvesting complexes*) (LHCs), que são codificados por uma família multigênica LHC. A expressão desses genes é estreitamente regulada pela luz (Escoubas et al., 1995; Nyiogi, 1999). Altas intensidades de luz podem inibir a transcrição dos genes LHC e ativar a síntese das proteínas induzidas pela luz *early light induced proteins* (ELIPs), uma classe de proteínas estruturalmente relacionadas ao LHCs (Pötter & Kloppstech, 1993).

A resposta das plantas aos fatores ambientais implica na ativação transcricional ou repressão de genes (Zhu, 2002). Diversos estudos sobre a melhoria da resistência ao estresse revelaram a passagem e a sobreposição entre as diferentes rotas metabólicas e a ativação para tolerar o estresse. A super expressão do elemento “dehydration responsive element binding” (DREB) 1A, devido à desidratação, resulta em plantas mais tolerantes à seca, ao sal e ao frio, mas ainda assim à custa do crescimento e da produtividade (Kasuga et al., 1999). No entanto, a expressão de DREB1A controlado por um promotor de estresse induzido melhora a tolerância ao estresse sem afetar o desenvolvimento das plantas, o que demonstra a necessidade de uma resposta orientada. Em outro exemplo, a super expressão do fator de transcrição de choque térmico (HSF) A2 confere maior tolerância à temperatura, sal e estresse osmótico, mas também resulta no crescimento retardado (Ogawa et al., 2007). Tomados em conjunto, a tolerância ao estresse pode atrasar o período de senescência, induzido pelo estresse, sendo assim um fator importante no controle do início da senescência. Curiosamente, a resposta ao estresse e a senescência sinalizam a sobreposição de rotas, de mais de dois terços dos fatores de transcrição induzidos durante a senescência (Chen et al., 2002).

Sakuma et al. (2006) mostrou com experimentos de microarranjo de RT qPCR, que o gene DREB2 pode ser regulado e/ou induzido por *HS-stress* (*heat-shock stress* – estresse por choque térmico), HSP e genes da super família LEA. Em resumo, DREB2A mostrou desempenhar um papel importante na ligação e resposta entre seca e estresse térmico. DREB2A é induzido por HS-stress e contém um elemento SH no promotor. Além disso, DREB2A controla os HSF como *downstream* genes. Este complexo de transcrição em cascata pode permitir a resposta adequada das plantas ao calor e ao estresse hídrico.

O choque térmico (heat shock-SH) é um sistema conservado de resposta celular para o mecanismo de defesa, que é ativado por uma variedade de estímulos tais como temperatura elevada e um número de componentes químicos. É caracterizada por uma rápida reprogramação da expressão gênica, levando ao acúmulo de proteínas de choque térmico (HSPs), a maioria das quais atuam como chaperonas (Morimoto, 1998; Schöffl et al., 1998).

Segundo Kim et al. (2003) ocorreu acúmulo de mRNA de EDR1 sob ferimento, em caso de seca e sob alta concentração de sal. O gene EDR1 pode atuar sinalizando rotas tanto para o etileno como para o ácido salicílico (SA) e ainda regula a senescência e morte celular (Tang & Ines, 2002). Assim, a resposta a vários estresses é regulada pela sinalização das vias que podem ser interligadas a vários fatores genéticos (Knight & Knight, 2001). Uma classe comum de moléculas sinalizadoras são as espécies reativas de oxigênio (ROS), que têm sido usadas na regulação do desenvolvimento e nas rotas responsivas ao estresse (Pitzschke & Hirt, 2006). Entre as diferentes espécies de ROS apenas o peróxido de hidrogênio pode atravessar membranas e, portanto, funcionar como uma molécula sinalizadora entre as células. O peróxido de hidrogênio está envolvido em vários processos, incluindo o fechamento estomático via ABA-dependente (McAinsh et al., 1996), a via de sinalização do receptor ETR1 (Desikan et al., 2005) e a explosão oxidativa durante o ataque do patógeno, com

posterior indução de imunidade sistêmica (Alvarez et al., 1998). A resposta da planta ao ROS é determinada pela localização do sinal na célula onde são produzidos ou acumulados.

Para a correta orientação das proteínas para o vacúolo ou outras organelas do sistema de membranas é dependente da ação de SNAREs (soluble NSF attachment protein receptors). A maioria das SNAREs são proteínas de membrana do tipo II (domínios “coiled-coil”) que são importantes para a interação com outros SNAREs. As proteínas SNARE são divididas em dois grupos, vesicle- SNAREs (v- SNAREs) e meta-SNAREs (t- SNAREs), que estão localizadas na membrana alvo (Surpin et al., 2003).

Os resultados de análises da expressão gênica em plantas modelo, cultivadas em condições de estresses abióticos, permitiram revelar a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas dos vegetais a esses estresses (Shinozaki & Dennis, 2003). Esses mecanismos moleculares estão centrados na ativação e regulação da expressão de vários genes, cujos produtos protéicos podem estar envolvidos tanto na resposta (percepção, tradução do sinal e controle da expressão gênica/fatores de transcrição) como na tolerância ao estresse (antioxidantes, protetores osmóticos, transporte iônico, etc) (Shinozaki & Dennis, 2003).

Neste trabalho, objetivou-se analisar os níveis de expressão gênica de 29 genes pré-selecionados em estudos de macroarranjos de cDNA, como responsivos ao estresse hídrico, utilizando-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para as reações de qPCR, o RNA obtido de amostras de folhas dos clones 14 e 22 (irrigado e não irrigado) e mais outros dois clones tolerantes (clones 73 e 120), também em condições de estresse hídrico e controle, foram utilizados. Em sua maioria, os resultados obtidos com as análises de qPCR corroboraram com a expressão diferencial entre os tratamentos

(controle x estresse hídrico), previamente observada nos experimentos com macroarranjos.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A análise da expressão dos genes previamente identificados como diferencialmente expressos, nos experimentos de macroarranjos, foi feita com reações de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) utilizando-se o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Esse procedimento foi realizado com 29 genes diferenciais. O experimento de qPCR foi realizado com a utilização do fluoróforo Platinum<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen). Para as reações de qPCR, o RNA obtido de amostras de folhas dos clones 14 e 22 (irrigado e não irrigado) e mais outros dois clones tolerantes (clones 73 e 120), também em condições de estresse e controle, foram utilizados.

Na tabela 1 estão listados os de pares de *primers* desenhados para cada gene candidato, as respectivas seqüências e a provável identidade protéica. Esses *primers* foram ressuspensos em água Milli-Q com a utilização de ponteiras com filtro (para evitar contaminação) a uma concentração de 100µM e posteriormente diluídos para 10µM em outro tubo, constituindo-se a amostra de trabalho.

TABELA 1 Descrição dos *primers* desenhados a partir das seqüências dos genes pré-selecionados com os experimentos de macroarranjos, a descrição do BLAST hit e acesso, o nome do contig ou singlet (café) e as seqüências *foward* e *reverse* dos *primers*, além dos primers de ubiquitina usados como controle endógeno.

Acesso \ Gene	Contig\Singlet	Seqüência
<b>emb CAD14213.1  probable dtdp-4-dehydrorhamnose reductase oxidoreductase protein</b>	Contig2236	F-CAGACGAAAATAAGCGAGAATCA R-GATTTTATGCCTTGCGGACAA
<b>gb AAK62372.1  Unknown protein</b>	Contig11443	F-AGATGATCAGATGCCTCGGTTT R-CATGGCAAGACGACCAGAGA
<b>gb AAK49535.2  chloroplast protein 12</b>	Contig11894	F-CAGGGACCGCAAGAAAGAGA R-GCATGACCGAAATCAGTTGTCA
<b>gb ABE92615.1  TRAF-like</b>	Contig 12677	F-GACTCTGGGCACATCGTGATAG R-TGCGAAGGAAAGAATGGAA
<b>gb ABE84886.1  Prephenate dehydrogenase</b>	Contig 17550-1	F-GAAAGTCCGCATCAGGAATGA R-ATCGTGCTCTTCGCATGTCA
<b>gb ABE84886.1  Prephenate dehydrogenase</b>	Contig17550-2	F-GCAGGGACATGGACGAATTT R-TGAAACGGCATGGACTTGAC
<b>NP_563958.1  unknown protein</b>	Contig17896	F-GCTTTCCAAGTTACAGAGCAAGGT R-AGTGGTAAGGTCTGGGAATGCA
<b>NP_850230.1  unknown protein</b>	Contig18100	F-CTCGCGTGGCCGAGATT R-CCCTCACATTTCCACGTGAAT
<b>dbj BAA33755.2  chloroplast FtsH protease</b>	Contig18175	F-ACGGGTGGCAAGACAGATG R-CTGCTGACCAAGGAAGGGATT
<b>gb ABE88499.1  hyp. protein MtrDRAFT</b>	Contig18310	F-CTGTTCCAAGCTGGGACAATATT R-CCAGCAAGAACCTCCAATCG

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

<b>AF479309_1 putative early light induced protein</b>	Contig18336	F-GCCAACCTTCAGAGTCAGAAGCA R-CAGGATTAGGCTGGGCAACA
<b>gb ABB29948.1  vesicle transport v-SNARE 11</b>	Contig18345	F-TCATCGGCTCCATTATTGCA R-AACGGGTTTCCCAAAGAAGAG
<b>ref NP_179721.1  oxidoreductase</b>	Contig18353	F-TCTTAGCCAGCCCTTTACTCGTA R-CGCAGCAATACCCAGAAGAAC
<b>AAP80625.1  NADPH</b>	Contig18376	F-TGAAGCCAGCTGTGAATCAACT R-GGTGTGGGCAGTGACACAGA
<b>ABC68275.1  dehydrin</b>	Contig18390	F-TTAATAGCAGCTTTCCAGTGTGTCA R-GATCCCCCAAAAAGCAGAAAA
<b>gb AAU29200.1  glyoxisomal malate dehydrogenase</b>	Contig18455	F-GCATGGAGGCTTAACCTGTGA R-CCAGCCTTTGCCTGAACAAC
<b>AAS00691.1 metal-nicotian. transp. YSL1</b>	CC00-XX-SH3-033-B08-EM.F	F-TAGTATGACGCCCCCTTTGC R-CGTAACAGAGATGCAGGCATTG
<b>ref NP_918379.1  putative zinc protease PQL</b>	CC00-XX-SH3-038-B10-EM.F	F-GGCATCTCGTTGGAAGGTT R-AACTGCCAAGCCAGCAATG
<b>gb ABC55670.1  dehydrin DH1a</b>	CC00-XX-SH3-053-D09-EM.F	F-GCCGCTCTCTCAAAGCTCTGT R-CGGAGGAATCGAGAGCATCT
<b>gb AAG31142.1  EDR1 [Hordeum vulgare]</b>	CC00-XX-SH3-054-B02-EM.F	F-TGTCAAATTGATGAAAAGCGAAGA R-AGGAAAAGTAGGAAATCAGCCAAA
<b>emb CAB56850.1  catalase</b>	CC00-XX-SH3-055-G11-EM.F	F-TGTGGAATGCCGACATCATC R-CCTTGTCGATCAGAGTGTAAGCA
<b>gb AAM96945.1  small heat shock protein</b>	CC00-XX-SH3-056-B04-EM.F	F-GGTAGGACGCCATGGGAGAT R-CCTCAACCCACACCTTCACAT
<b>gb AAG28899.1  F12A21.29</b>	CC00-XX-SH3-058-H04-EM.F	F-GAGAGGCAAAAATCACGAAGGA R-ACAGCCTCTGTTTTCTGCCATT
<b>NP_179721.1  oxidoreductase</b>	CC00-XX-SH3-060-G02-EM.F	F-TGAAGCCAGCTGTGAATCAACT R-GTGTGGGCAGTGACACAGATG

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

NP_179721.1  oxidoreductase	CC00-XX-SH3- 069-F05-EM.F	F-AATCAGCAATTACAGCGTTTTGC R-AGTGACACAGATGCCGTGCTT
ref XP_463936.1  put. NADPH-dep. mannose 6-phosphate reductase	CC00-XX-SH3- 074-D10-EM.F	F-CACCGTATTGTACGACTTCTTGCT R-CATCAGGCACCAGCTTTTGA
dbj BAF10321.1  Os02g0799000	CC00-XX-SH3- 075-A12-EM.F	F-GCCTTTGCATTCTCCATTGGT R-CAGCGGAACATGATCCAAAA
gb AAB95251.1 ubiquitin	Contig 6325	F-AAGACAGCTTCAACAGAGTACAGCAT R-GGCAGGACCTTGCTGACTATA

Para as reações de qPCR, foi extraído e quantificado para cada amostra experimental, 1 µg de RNA total, de acordo com o protocolo do Kit Concert<sup>®</sup> (Invitrogen). Após a análise da qualidade do RNA, procedeu-se o tratamento com **Kit RQ1 RNase-Free DNase** (Promega) para retirada de todos os vestígios de DNA genômico que por ventura estivessem presentes na amostra. A reação foi feita seguindo o protocolo, com algumas alterações. Ao microtubo contendo 1 µg de RNA diluído em 50 µl de água (Milli-Q autoclavada) foram adicionados 10 µl de tampão 10X (presente no kit), 5 µl da enzima DNase, 35 µl de água. O microtubo foi então, submetido a um banho seco a 37°C por 15 minutos para degradar o DNA presente na amostra. Após esse período, foram adicionados 10 µl de *Stop Solution* (presente no kit) e o microtubo incubado a 65°C por 10 minutos, visando-se finalizar a reação e degradar a enzima.

Para precipitação do RNA e retirada dos outros componentes, foram adicionados 10 µl de Acetato de Sódio 3M e 300 µl de etanol absoluto a -20°C. Após a centrifugação por 1 hora a 4°C, para precipitar o RNA, a fase aquosa foi descartada e o pélete foi lavado com 600 µl de etanol 70% e os microtubos centrifugados por 1 min. Após a retirada do etanol, os microtubos contendo

apenas o pélete de RNA foi colocado em banho seco à 37°C até secar. Posteriormente, o pélete foi ressuspensionado em água 25 µl Milli-Q autoclavada.

Para comprovar a ausência de DNA genômico na amostra, o que poderia interferir com falsos resultados de expressão, foi realizada uma reação de PCR utilizando-se um par de primers flanqueando um dos íntrons do gene constitutivo da Ubiquitina, e posterior verificação em gel de agarose a 1%. A reação de PCR foi realizada de acordo com as tabelas a seguir:

TABELA 2 Componentes e quantidade para reação de PCR.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade em µl</b>
<b>Água</b>	<b>40,75</b>
<b>Buffer</b>	<b>1,00</b>
<b>Primer Forward (10µM)</b>	<b>1,00</b>
<b>Primer Reverse (10µM)</b>	<b>1,00</b>
<b>Mix dNTPs</b>	<b>1,00</b>
<b>RNA</b>	<b>1,00</b>
<b>GoTaq (Enzima)</b>	<b>0,25</b>

TABELA 3 Condições de reação de PCR para comprovar ausência de DNA.

<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura em °C</b>	<b>Tempo (segundos)</b>	<b>Repetições</b>
<b>1</b>	<b>94</b>	<b>120</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>94</b>	<b>30</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>55</b>	<b>30</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>72</b>	<b>180</b>	<b>Ir p\ 2 - 40X</b>
<b>5</b>	<b>72</b>	<b>420</b>	<b>1</b>
<b>6</b>	<b>4</b>	<b>∞</b>	<b>1</b>
<b>7</b>	<b>-</b>	<b>Fim</b>	<b>-</b>

Após verificada a ausência de DNA nas amostras, foi realizada a síntese reversa do mRNA para a obtenção da fita de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit Improm-II™ Reverse Transcriptase da Promega seguindo o protocolo do fabricante. Em um microtubo eppendorf com 4µl de água MilliQ contendo 1 µg de RNA foi adicionado 1µl de oligo-DT à 10µM. A reação foi submetida a 70°C, por 6 minutos, para desnaturação e anelamento do primer oligo-DT, sendo posteriormente transferida para o gelo, por 5 minutos. Para a reação de transcriptase reversa foram utilizados os componentes (tabela 4) e condições (tabela 5), conforme descrito a seguir:

TABELA 4 Componentes e quantidade para reação de RT.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade em µl</b>
<b>Água</b>	<b>6,1</b>
<b>5X Run Buffer</b>	<b>4,0</b>
<b>Cloreto de Magnésio (50mM)</b>	<b>2,4</b>
<b>Enzima RT</b>	<b>1,0</b>
<b>Mix dNTPs</b>	<b>1,0</b>
<b>RNazin</b>	<b>0,5</b>
<b>RNA (com oligo-DT)</b>	<b>5,0</b>

TABELA 5 Condições para reação de transcriptase reversa (RT).

<b>Temperatura em °C</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Propriedade</b>
<b>25</b>	<b>5</b>	<b>Anelamento</b>
<b>42</b>	<b>60</b>	<b>Extensão</b>
<b>70</b>	<b>15</b>	<b>Inativar enzima</b>

Para verificar se a reação de RT foi eficaz, realizou-se uma nova reação de PCR (citada anteriormente) com o produto da RT diluído 50X em água Milli-

Q e utilizando-se um par de primers do gene constitutivo da Ubiquitina e posterior verificação em gel de agarose a 0,6%.

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se os componentes (tabela 6) e condições (tabela 7), descritas a seguir:

TABELA 6 Componentes e quantidade para reação de qPCR.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Syber Green</b>	<b>5,0</b>
<b>Primer Foward (10<math>\mu</math>M)</b>	<b>0,2</b>
<b>Primer Reverse (10<math>\mu</math>M)</b>	<b>0,2</b>
<b>Água</b>	<b>2,6</b>
<b>cDNA (1\50)</b>	<b>2,0</b>

TABELA 7 Condições para reação de qPCR.

<b>Temperatura em °C</b>	<b>Tempo (segundos)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>50</b>	<b>120</b>	<b>01</b>
<b>95</b>	<b>300</b>	<b>01</b>
<b>95</b>	<b>03</b>	<b>40</b>
<b>60</b>	<b>30</b>	<b>40</b>

Após a realização de um ensaio com as diluições das amostras de cDNA de 1:10, 1:50, e 1:100, verificou-se que a melhor diluição para a condução dos experimentos foi a de 1:50 visto que, o início da curva de amplificação, se deu por volta do ciclo de número 22 na reação de qPCR.

Para a verificação de ausência de contaminação dos primers e, possível inespecificidade destes, foi realizada a curva de dissociação das reações e, com a curva gerada foi possível confirmar a presença de um único produto, com uma mesma temperatura de dissociação.

A quantificação de transcritos dos genes pesquisados foi realizada por meio de análises por PCR Quantitativo em tempo real (qPCR) tendo o transcrito do gene constitutivo da ubiquitina como padrão interno na normalização dos dados. As reações foram feitas em triplicatas.

Após a verificação da eficiência de cada par de *primer* testado, possibilitando a quantificação relativa, foi estabelecido que a expressão de referência para as análises de quantificação relativa seria com os dados da amostra do clone 22 Irrigado, pois este apresentou os menores níveis de expressão para a maioria dos genes testados.

Os dados dos experimentos de qPCR, foram exportados e analisados em planilhas de Excel, considerando-se como normalizador os resultados do gene constitutivo de ubiquitina. De acordo com Cruz et al. (2009), o gene de ubiquitina (UBI9), apresentou ser constitutivo e estável em vários tecidos de plantas de *C. arabica*, sendo portanto, um bom controle endógeno para experimentos de PCR quantitativo em tempo real.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise dos resultados de qPCR para genes de café, pré-selecionados como responsivos ao estresse hídrico, em experimentos de macroarranjos

A partir das análises dos dados de macroarranjos, um conjunto de 29 genes foi selecionado para a construção de pares de *primers*, visando-se a realização de experimentos de qPCR. Os resultados das análises de qPCR desses genes, responsivos ao estresse hídrico, em grande corroboraram com os dados previamente obtidos com os experimentos de macroarranjos, onde para a maioria dos genes testados, foi observada expressão diferencial, principalmente nos entre os tratamentos controle e não irrigados (Figura 1).

Na figura 1, observa-se também, a ausência de expressão de alguns genes como o Contig 12677, Contig 17896, Contig 18390, SH-033-B08 e SH3-054-B02. Isso porque o nível de expressão desses genes foi muito menor quando comparada aos demais genes. Ao observar a expressão diferencial isoladamente de cada um dos genes, foi possível visualizar a diferença entre os clones e tratamentos.

A expressão de cada um dos genes analisada dentro do conjunto dos tratamentos, validou, em sua maioria, as observações descritas no capítulo 2. Alguns genes, entretanto, não apresentaram a tendência esperada e outros não apresentaram expressão, podendo ser devido ao desenho incorreto dos pares de *primers*. Os pares de *primers* que não amplificaram são os correspondentes aos Contigs 2236, 18353, 18455 e os singlets SH3-055-G11 e SH3-074-D10.

Dos pares de *primers* utilizados nos experimentos de qPCR, nove não apresentaram resultados correspondentes com a expressão observada nos experimentos de macroarranjo. Foram estes: Contig11443, Contig11894, Contig18175, Contig18310, SH3-038-B10, SH3-053-D09, SH3-058-H04, SH3-060-G02 e SH3-075-A12. Vários fatores podem explicar essa observação, tais como a amplificação de alelos diferentes dos esperados. Uma re-análise da montagem desses contigs torna-se necessária para uma melhor avaliação dos resultados.

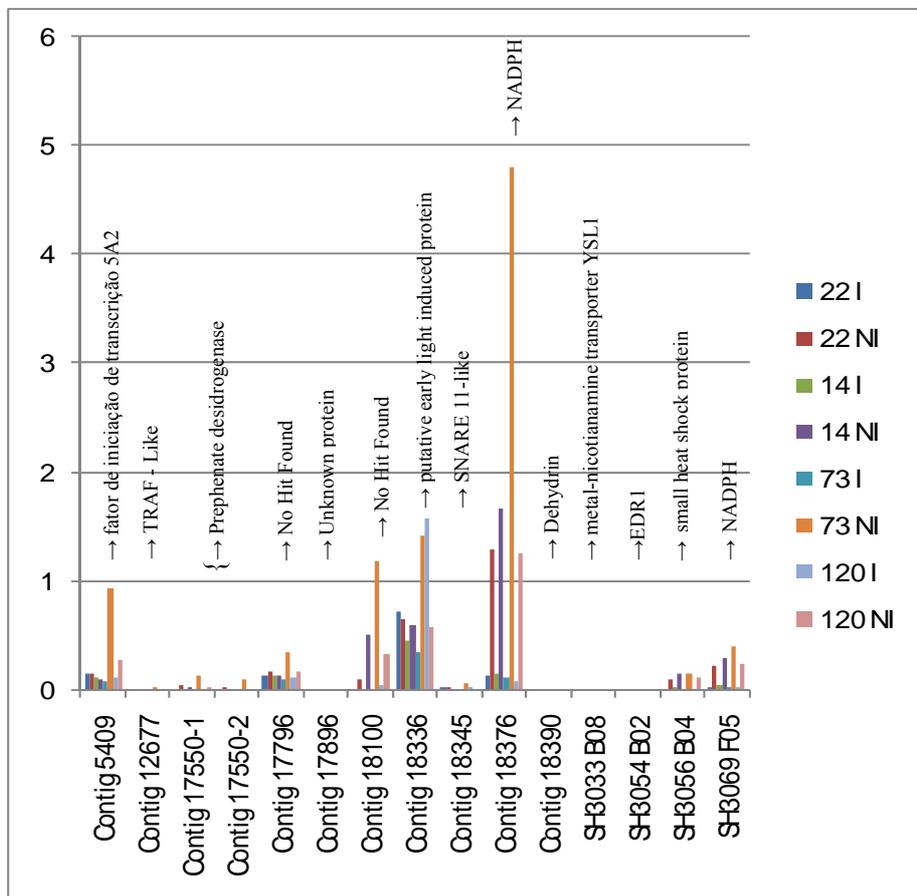


FIGURA 1 Expressão dos genes, que corroboraram com os resultados de macroarranjo, em todos os tratamentos.

Para os genes representados pelos Contigs e Singlets: Contig 5409, Contig 12677, Contig 17550-1, Contig 17550-2, Contig 17896, Contig 18100, Contig 18376, Contig 18390, SH3-054-B02, SH3-056-B04, SH3-069-F05, foi possível observar expressão diferencial por meio dos experimentos de qPCR, principalmente nos tratamentos não irrigados, conforme pode-se observar nas figuras a seguir.

Na figura 2 observa-se a expressão do gene que codifica o TRAF-like, que é um motivo característico de fatores de transcrição (*zinc finger*), representado pelo Contig 12677 e está associado com a recepção da sinalização de estresse. Foi verificada a expressão superior nas condições não irrigadas dos clones (com exceção do clone 120).

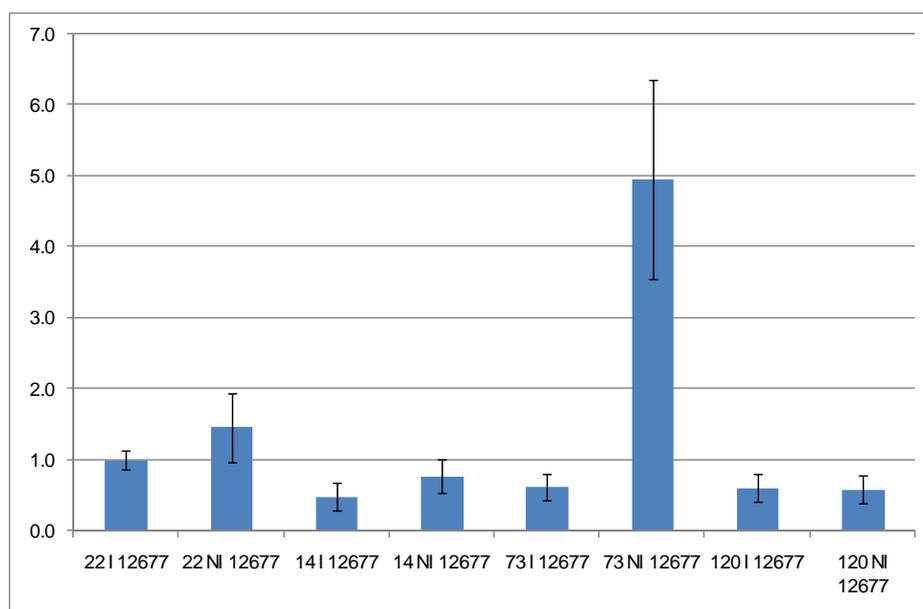


FIGURA 2 Expressão do gene TRAF-like amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 12677.

A enzima Prephenate desidrogenase está presente na via metabólica onde serão formados compostos aromáticos como a tirosina e a fenilalanina, as quais são precursores de Vitamina E (tocoferol) que possui a função de proteger membranas biológicas contra o estresse oxidativo (Rippert & Matringe, 2002; Rippert et al., 2004). A expressão gênica desta enzima também foi diferencial,

nos experimentos de qPCR, com a utilização dos *primers* correspondentes às seqüências dos Contigs 17550-1 e 17550-2 (figuras 3 e 4).

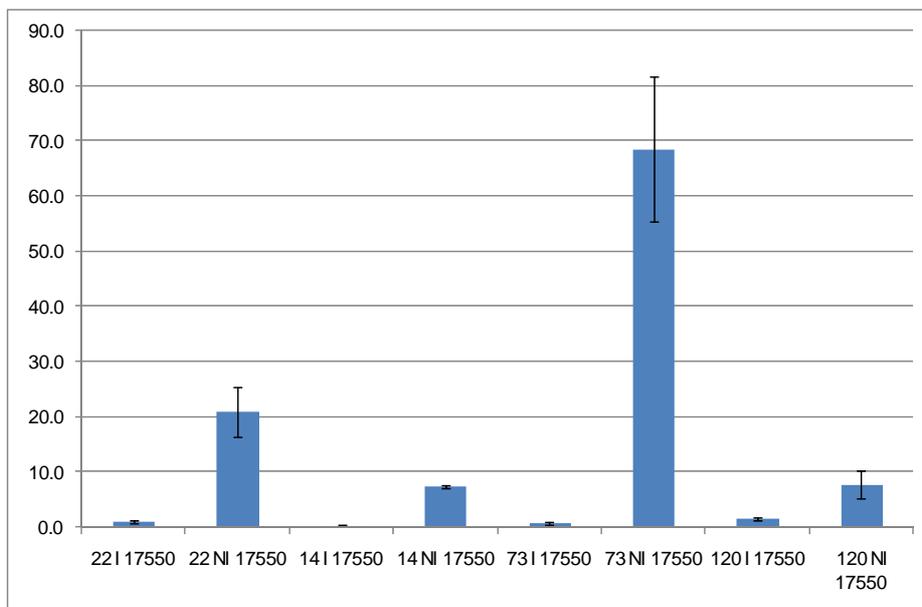


FIGURA 3 Expressão do gene Prephenate dehydrogenase amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 17550-1.

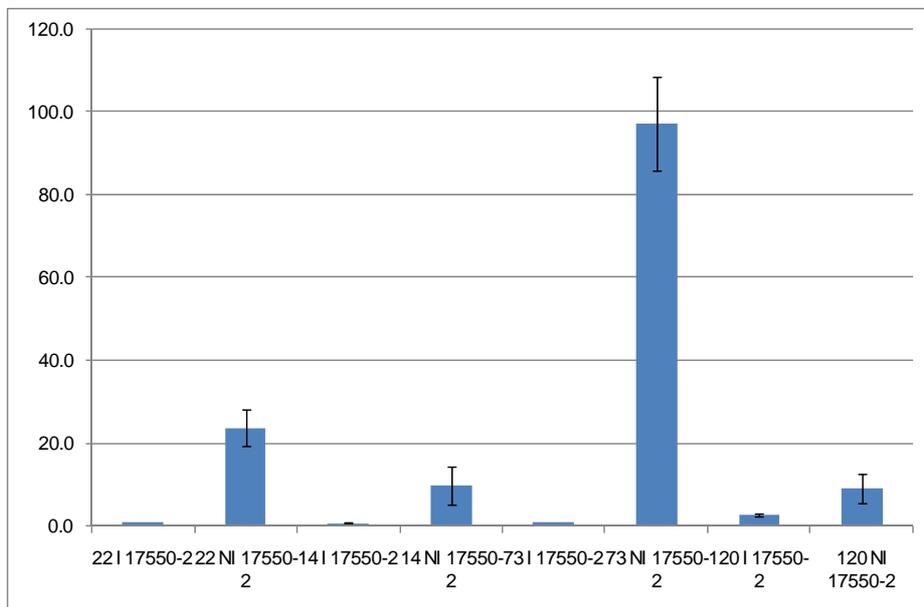


FIGURA 4 Expressão do gene Prephenate dehydrogenase amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 17550-2.

Para os genes que são considerados “no hits” ou proteínas com função desconhecida, selecionados para as análise de qPCR, a expressão gênica encontrada por qPCR, foi correlacionada com os dados obtidos com os macroarranjo, utilizando-se os *primers* desenhados a partir das seqüências dos Contigs 17896 e 18100, apresentados nas figuras 5 e 6, respectivamente.

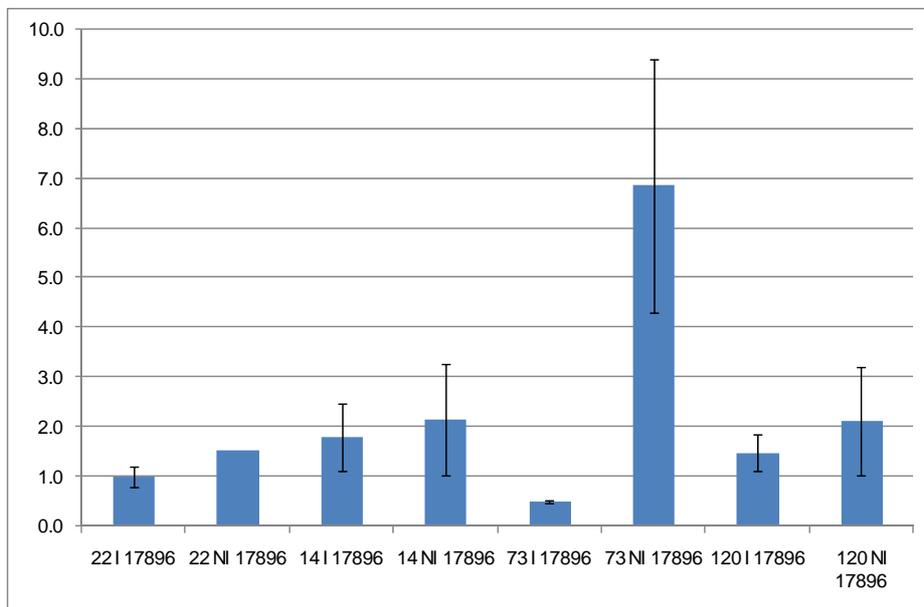


FIGURA 5 Expressão do gene de uma proteína desconhecida amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 17896.

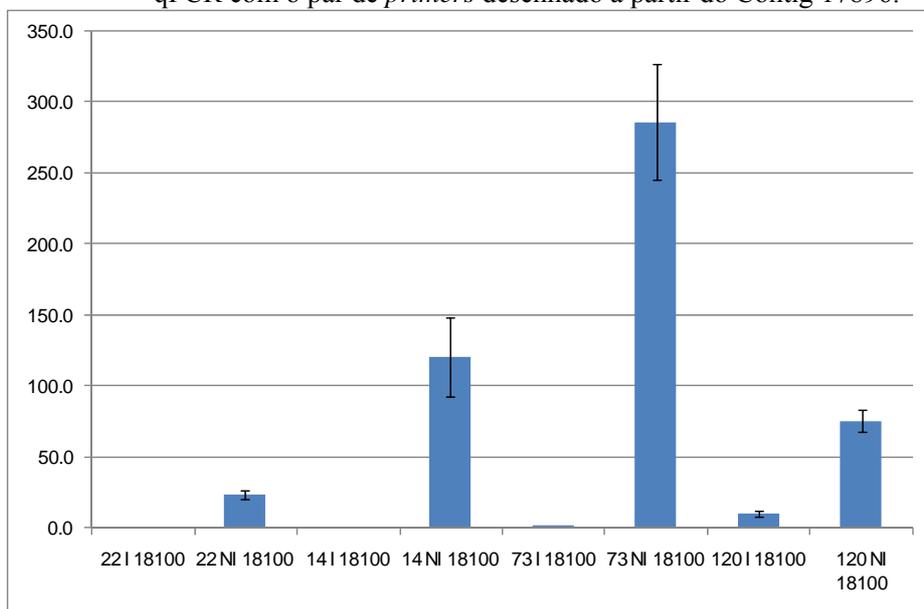


FIGURA 6 Expressão do gene de um no hit amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 18100.

A expressão do gene “putative early light induced protein”, está associada ao estresse ocasionado pela luz (fotossensível) que pode gerar espécies reativas de oxigênio. O Contig 18336, que codifica esta proteína, está representado na figura 7 revelando a maior expressão nas condições estressadas dos clones 14 e 73. Nos clones 22 e 120 apresenta maior expressão, na condição irrigada. Tal fato pode se dar devido a diferentes mecanismos de resposta da planta ao estresse.

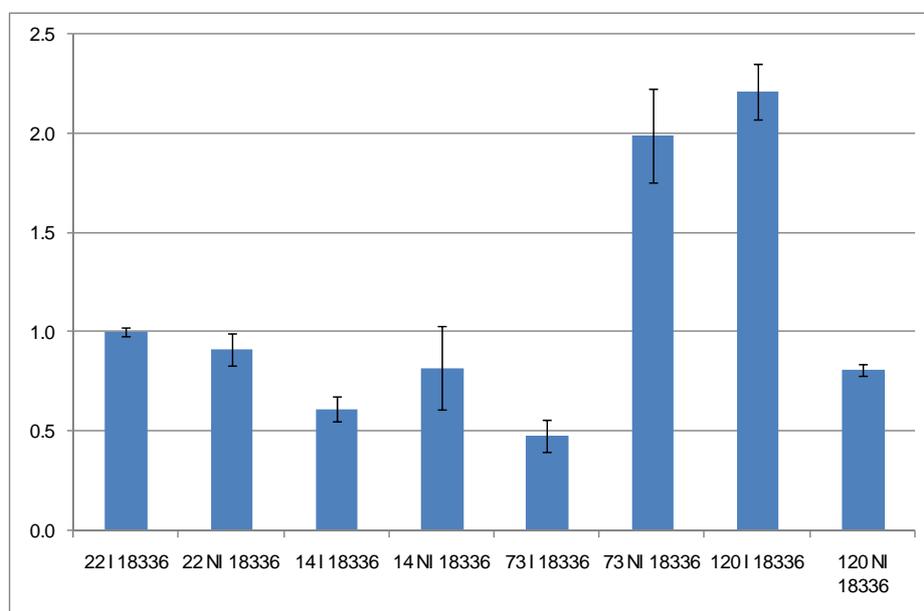


FIGURA 7 Expressão do gene “putative early light induced protein” amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 18336.

Segundo Surpin et al. (2003), a expressão do gene “vesicle transport v-SNARE 11-like” pode ocorrer em situações de estresse osmótico, atuando no transporte de osmoprotetores. Este gene foi amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 18345 e os resultados mostraram que este

gene possui maior expressão na condição de estresse hídrico em dois clones (14 e 73) e pode estar envolvido na resposta ao estresse (figura 8).

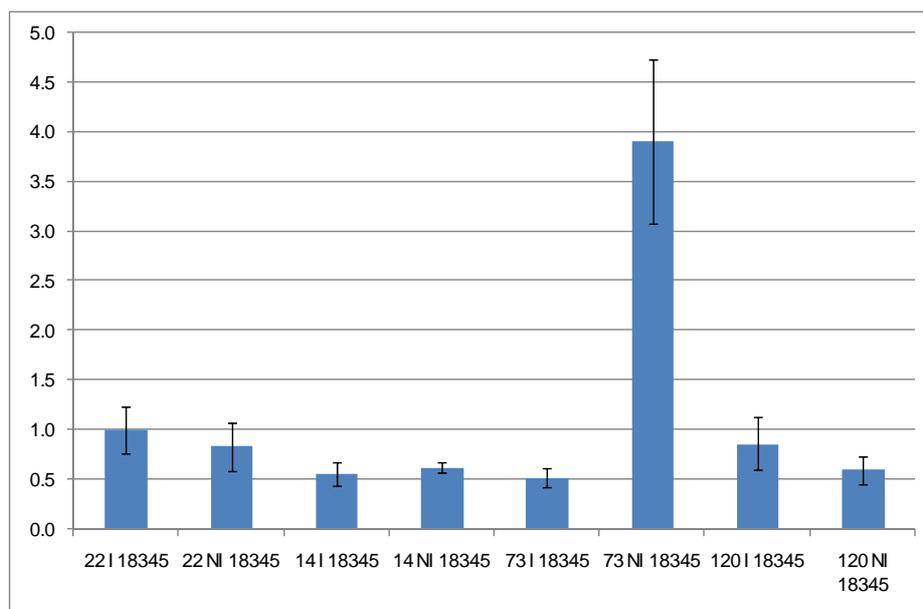


FIGURA 8 Expressão do gene “vesicle transport v-SNARE 11-like” amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 18345.

De acordo com Nylander et al. (2001), as desidrinas são expressas nas condições de estresse hídrico, e os dados observados com os experimentos de macroarranjo foram confirmados por qPCR, utilizando-se um par de *primers* desenhado a partir da seqüência do Contig 18390. A expressão foi diferencial entre os tratamentos, como pode ser observado na figura 9.

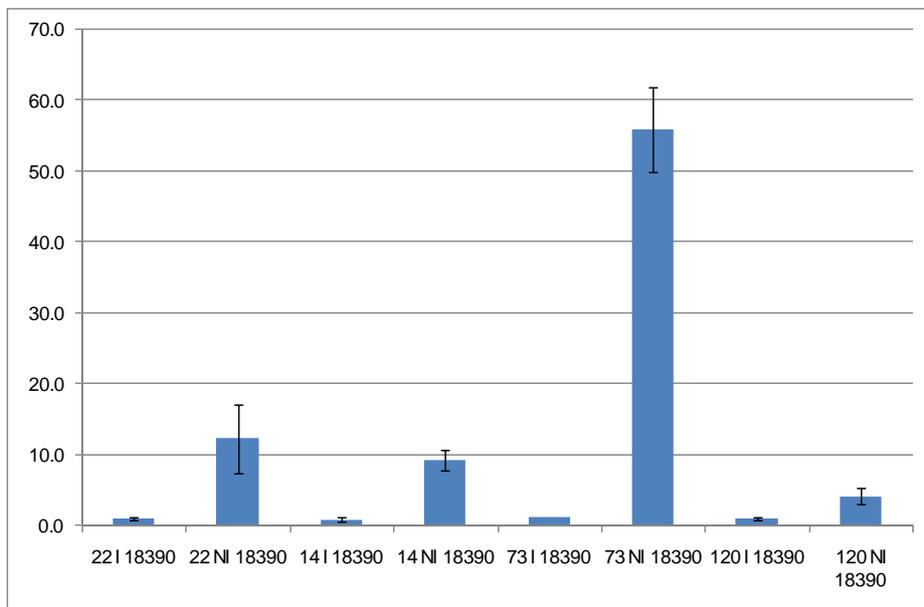


FIGURA 9 Expressão do gene dehydrina amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 18390.

No caso dos genes que quando traduzidos atuam como transportadores de íons, estes geralmente são encontrados com a expressão alterada em condições de estresse salino, evitando-se assim, a toxicidade desses íons à planta. Na figura 10 (Singlet SH3033-B08) pode-se notar que a expressão de um gene de café com similaridade ao transportador YSL1, foi superior na condição de estresse hídrico para a maioria dos clones tolerantes. Enquanto que, para o clone sensível (22) e o clone 120, a expressão foi maior na condição irrigada, o que mostra que podem existir diferentes mecanismos de resposta ao estresse, resultando em tolerância.

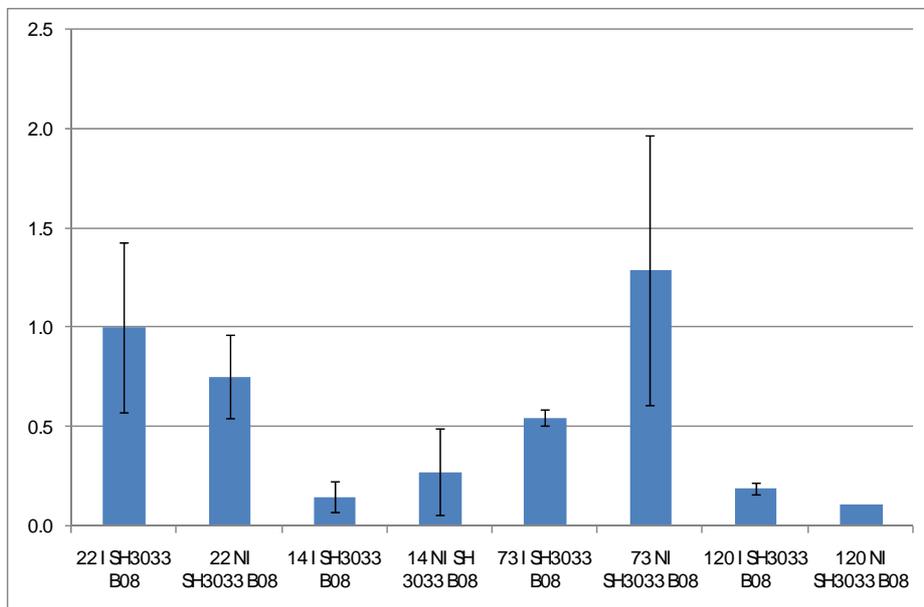


FIGURA 10 Expressão do gene “metal-nicotiamine transporter YSL1 amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Singlet CC00-XX-SH3-033-B08-EM.F.

Na figura 11 é possível visualizar que os dados de qPCR, para um gene de café com alta similaridade ao EDR1(Singlet SH3054), mostram que esse gene apresenta maior expressão na condição estresse hídrico para todos os clones avaliados.

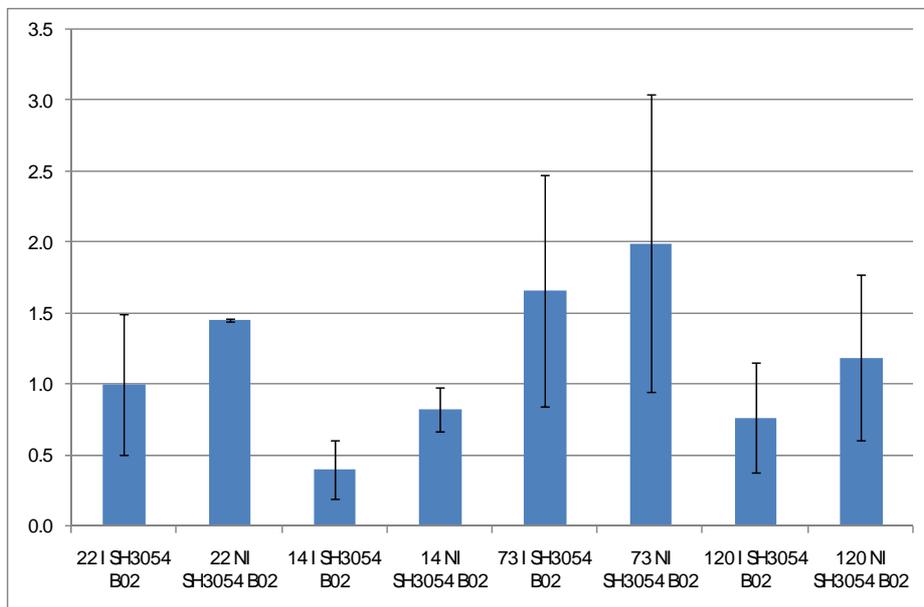


FIGURA 11 Expressão do gene EDR1 amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Singlet CC00-XX-SH3-054-B02-EM.F.

De acordo com Wiederrecht et al. (1987), a expressão do gene “small heat shock protein” atua na forma de protetor de macromoléculas. Os resultados de qPCR utilizando-se o par de *primers* desenhado a partir do Singlet SH3-056-B04, mostrou elevada expressão na condição de estresse hídrico (figura 12).

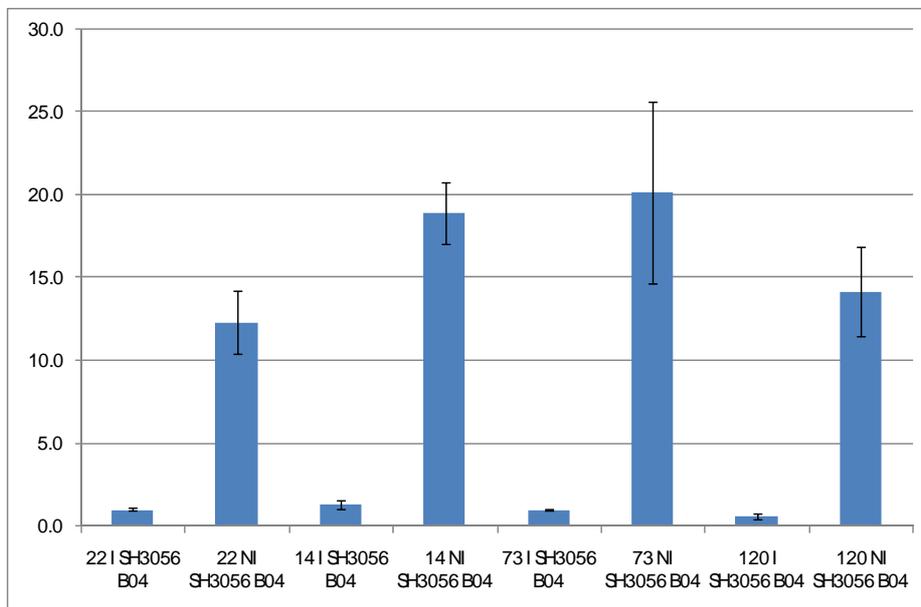


FIGURA 12 Expressão do gene “small heat shock protein” amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Singlet CC00-XX-SH3-056-B04-EM.F.

Os genes de café, que codificam proteínas com similaridade à NADPH-*dependent mannose 6-phosphate reductase* ou oxiredutase, foram identificados e validados tanto nos experimentos de macroarranjo como na reação de qPCR, quando se utilizou os *primers* desenhados a partir do Contig 18376 (figura 13) e do Singlet SH3-069-F05 (figura 14). Entretanto, quando foi utilizado o par de *primers* desenhado a partir da seqüência do Singlet SH3-060-G02 (figura 15), pode-se observar uma maior expressão na condição irrigada, para todos os clones testados, diferentemente da análise dos resultados observados nas análises de macroarranjos. Tal diferença pode ser devido à presença de vários alelos que codificam esta proteína.

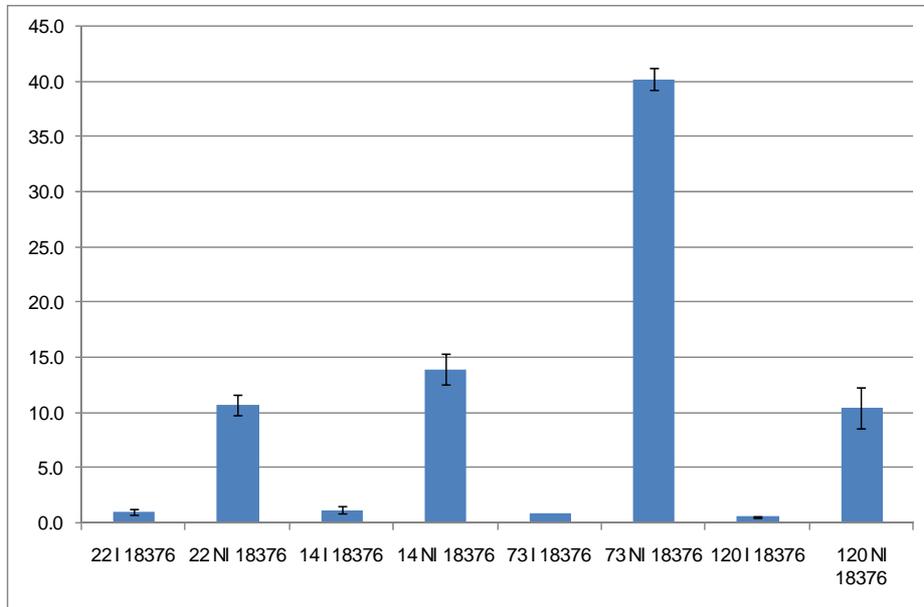


FIGURA 13 Expressão do gene *NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase* amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 18376.

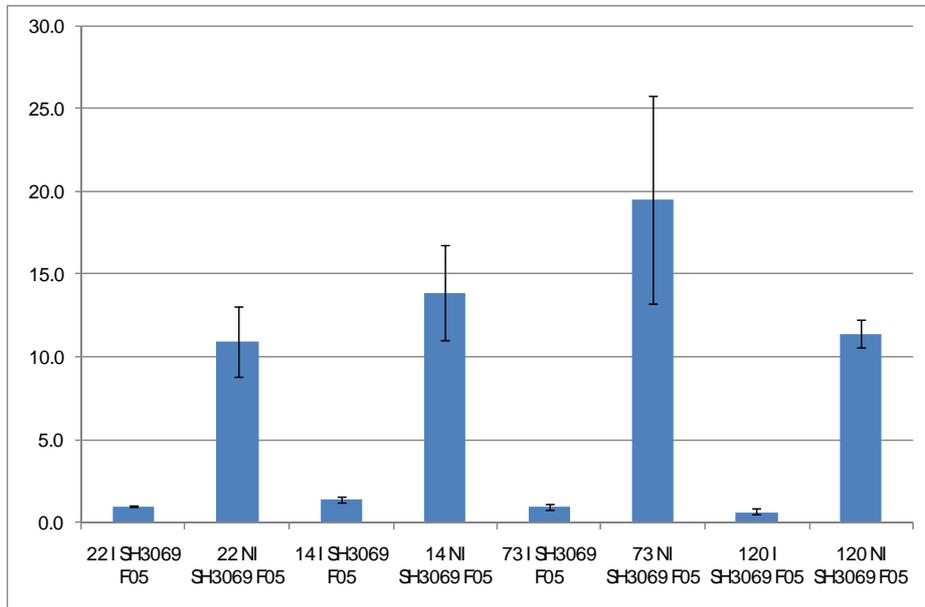


FIGURA 14 Expressão do gene oxireductase amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Singlet CC00-XX-SH3-069-F05-EM.F.

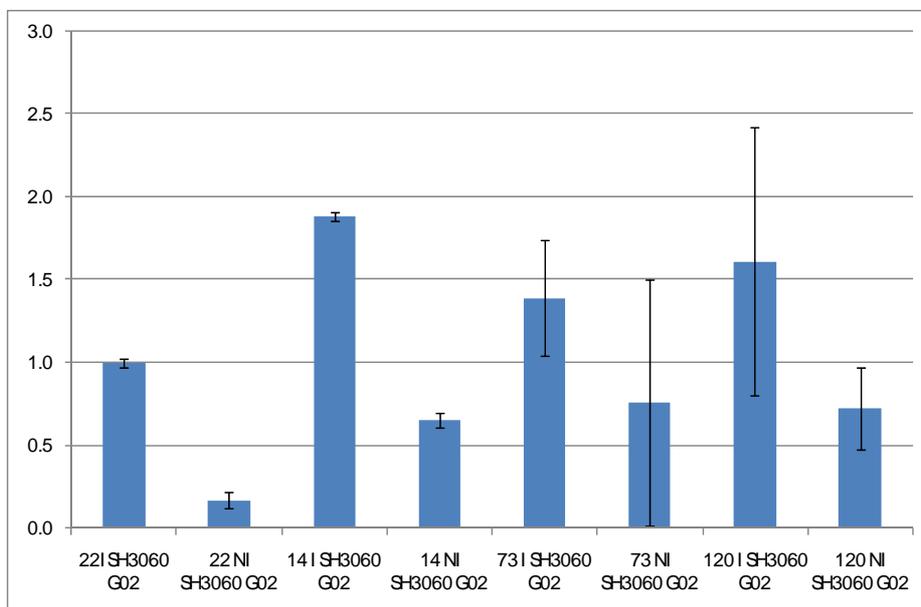


FIGURA 15 Expressão do gene oxireductase amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Singlet CC00-XX-SH3-060-G02-EM.F.

De acordo com a figura 16, onde mostra a expressão de um fator de iniciação da transcrição (5A2) foi possível observar pouca variação na expressão entre os clones 14 e 22 em ambas as condições. Já para os clones 73 e 120, pode-se observar uma maior expressão nas condições de estresse hídrico. Esta diferença pode ser explicada pela presença de diferentes alelos e/ou diferente respostas ao estresse hídrico entre os materiais genéticos estudados.

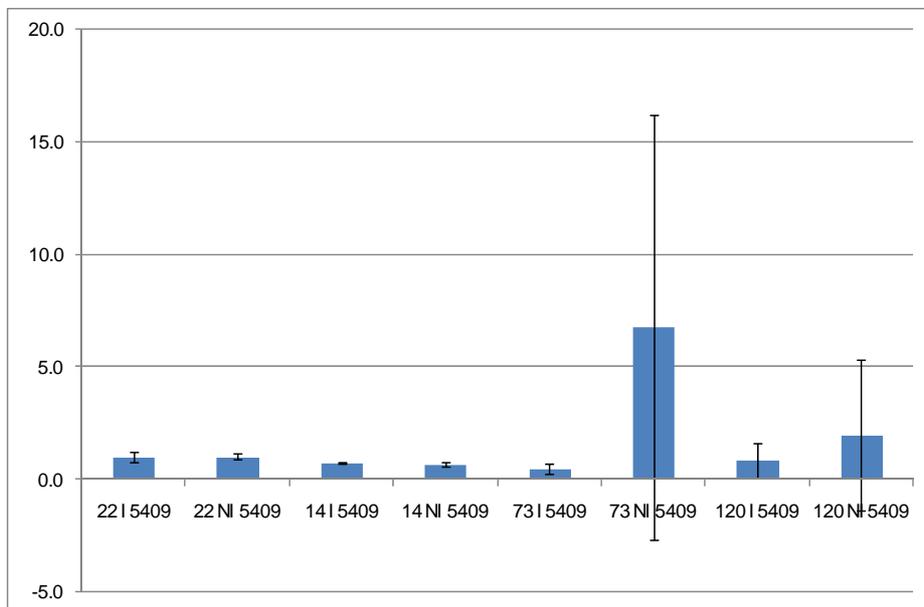


FIGURA 16 Expressão de um fator de iniciação da transcrição 5A2, amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 5409.

Outro gene considerado “no hit”, foi selecionado para análises de qPCR, utilizando-se os *primers* desenhados a partir das seqüências do Contig 17796. Os resultados apresentados na figura 17 indicam que apesar de ter sido verificada pouca diferença entre os clones 22 e 14, pode-se observar uma expressão ligeiramente mais elevada nas condições de estresse hídrico. Já no caso dos clones 73 e 120 foi verificada claramente, uma maior expressão nas condições não irrigadas.

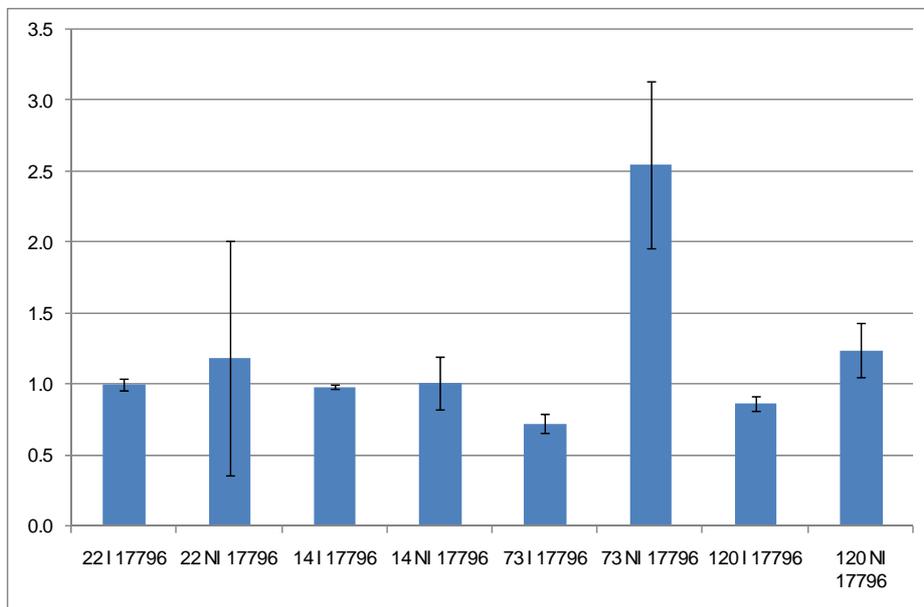


FIGURA 17 Expressão de um No Hit, amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do Contig 17796.

A tabela 8 apresenta uma síntese dos resultados de qPCR, que corroboraram com as análises de macroarranjo, realizados neste trabalho. Todas as comparações foram analisadas, indicando as diferenças na expressão gênica entre os tratamentos.

TABELA 8 Análise comparativa entre os tratamentos para os diferentes clones, tomando por base as reações de qPCR. (-) nenhuma expressão, (+) pouca expressão, (++) expressão moderada e (+++) expressão elevada.

	14 I	14 NI	22 I	22 NI	73 I	73 NI	120 I	120 NI
Qg 5409	+	+	+	+	+	+++	+	++
Qg 12677	+	+	++	++	+	+++	+	+
Qg 17550-1	-	+	+	++	+	+++	+	+
Qg 17550-2	-	++	-	++	-	+++	+	++
Qg 17796	++	++	++	++	++	+++	++	++
Qg17896	++	++	+	++	+	+++	++	++
Qg 18100	-	++	-	+	-	+++	+	++
Qg 18336	++	++	++	++	++	+++	+++	++
Qg 18345	+	+	++	+	+	+++	+	+
Qg 18376	+	++	+	++	+	+++	-	++
Qg 18390	+	++	+	++	+	+++	+	++
S-3033 B08	+	+	++	++	+	+++	+	+
S-3054 B02	+	++	+	++	++	+++	+	++
S-3056 B04	+	+++	+	++	+	+++	+	++
S-3069 F05	+	+++	+	++	+	+++	+	++

## 6 CONCLUSÃO

A maior parte dos genes pré-selecionados em experimentos de macroarranjos apresentaram resultados de qPCR diferenciais na condição de estresse hídrico. Em geral, os dados obtidos por qPCR indicaram uma resposta mais acentuada no clone 73, em condições de estresse hídrico quando comparado aos demais clones avaliados.

Nos experimentos de qPCR, nove genes não apresentaram resultados correspondentes com a expressão observada nos experimentos de macroarranjo. Vários fatores podem explicar essa observação, tais como a amplificação de alelos diferentes dos esperados ou a existência de muitos parálogos similares. Uma re-análise da montagem desses contigs e provavelmente, o desenho de novos primers torna-se necessário.

A técnica de qPCR foi eficiente em detectar diferenças nos níveis de expressão gênica entre os tratamentos testados (controle x não irrigado), assim como entre os materiais genéticos testados. A expressão diferencial de alguns genes, entre os materiais genéticos testados, indica que diferentes mecanismos podem estar associados à tolerância à seca em cafeeiro.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Todas as técnicas utilizadas neste trabalho, foram eficientes em identificar genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro, sendo que alguns genes apresentaram resultado positivo de expressão diferencial em todas as três metodologias utilizadas.

Vários genes responsivos à seca, identificados por meio das diferentes estratégias utilizadas neste estudo, já haviam sido descritos na literatura, como envolvidos nas respostas ao estresse hídrico em outras espécies vegetais, corroborando com dados experimentais obtidos neste estudo.

Além disto, a metodologia utilizada neste trabalho, possibilitou também, a identificação de vários novos genes com expressão diferencial em resposta ao estresse hídrico, genes esses, nunca antes descritos (*no hits*), abrindo novas possibilidades experimentais para a caracterização funcional destes genes.

Os vários genes candidatos responsivos à seca em cafeeiro, identificados neste trabalho, permitem uma melhor compreensão das estratégias utilizadas pela planta para suportar o déficit hídrico e esses genes, podem também ser usados, para o melhoramento biotecnológico do cafeeiro. Além disto, marcadores moleculares associados à tolerância à seca em cafeeiro podem ser desenvolvidos com base nos genes candidatos identificados, visando-se um programa de melhoramento genético do cafeeiro, por seleção assistida.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAGULOVA, C. H. R.; GIMALOV, F. R.; SHAKIROVA, F. M.; VAKHITOV, V. A. The plant dehydrins: structure and putative functions. **Biochemistry**, New York, v. 68, n. 9, p. 945-951, Sept. 2003.
- ALVAREZ, M. E.; PENNELL, R. I.; MEIJER, P. J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 6, p. 773-784, Mar. 1998.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, n. 4, p. 1035-1481, Dec. 1993.
- CHEN, W.; PROVART, N. J.; GLAZEBROOK, J.; KATAGIRI, F.; CHANG, H. S.; EULGEM, T.; MAUCH, F.; LUAN, S.; ZOU, G.; WHITHAM, S. A.; BUDWORTH, P. R.; TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, X.; LAM, S.; KREPS, J. A.; HARPER, J. F.; SI-AMMOUR, A.; MAUCH-MANI, B.; HEINLEIN, M.; KOBAYASHI, K.; HOHN, T.; DANGL, J. L.; WANG, X.; ZHU, T. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 3, p. 559-574, Mar. 2002.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 4, p. 795-803, Aug. 1996.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature: plant response to stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 291-296, June 1997.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L. M. G.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; VASLIN, M.; ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 1380, Feb. 2009.
- DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; BRIGHT, J.; HARRISON, J.; WEIR, I.; HOOLEY, R.; NEILL, S. J. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, n. 3, p. 831-834, Mar. 2005.

ESCOUBAS, J. M.; LOMAS, M.; LAROCHE, J.; FALKOWSKI, P. G. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 22, p. 10237-10241, Oct. 1995.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, June 1996.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K. Y.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 3, p. 287-291, Mar. 1999.

KIM, J. A.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; HAN, K. S.; KIM, K. N.; YUN, C. H.; HEU, S.; PARK, S. Y.; LEE, Y. H.; JWA, N. S. Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 300, n. 4, p. 868-876, Jan. 2003.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 262-267, June 2001.

KOAG, M. C.; FENTON, R. D.; WILKENS, S.; CLOSE, T. J. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. **Plant Physiology**, Washington, v. 131, n. 1, p. 309-316, Jan. 2003.

KREPS, J. A.; WU, Y.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 4, p. 2129-2141, Dec. 2002.

McAINSH, M. R.; CLAYTON, H.; MANSFIELD, T. A.; HETHERINGTON, A. Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. **Plant Physiology**, Washington, v. 111, n. 4, p. 1031-1042, Aug. 1996.

MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 24, p. 3788-3796, Dec. 1998.

NYIOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 333-359, June 1999.

NYLANDER, M.; SVENSSON, J.; PALVA, E. T.; WELIN, B. V. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 45, n. 3, p. 263-279, Feb. 2001.

OGAWA, D.; YAMAGUCHI, K.; NISHIUCHI, T. High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. **Journal of Experimental Botany**, Tokyo, v. 58, n. 12, p. 3373-3383, Sept. 2007.

PITZSCHKE, A.; HIRT, H. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 2, p. 351-356, June 2006.

PÖTTER, E.; KLOPPSTECH, K. Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 214, n. 3, p. 779-786, Mar. 1993.

RABBANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M. A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA Gel-Blot analyses. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, n. 4, p. 1755-1767, Nov. 2003.

RIPPERT, P.; MATRINGE, M. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Biochemistry**, Paris, v. 269, n. 19, p. 4753-4761, Oct. 2002.

- RIPPERT, P.; SCIMEMI, C.; DUBALD, M.; MATRINGE, M. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, n. 1, p. 92-100, Jan. 2004.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Y. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 49, p. 18822-18827, Dec. 2006.
- SCHÖFFL, F.; PRÄNDL, R.; REINDL, A. Regulation of the heat-shock response. **Plant Physiology**, Washington, v. 118, n. 4, p. 1135-1141, Dec. 1998.
- SHINOZAKI, K.; DENNIS, E. S. Cell signalling and gene regulation: global analyses of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 405-409, Oct. 2003.
- SURPIN, M.; ZHENG, H.; MORITA, M. T.; SAITO, C.; AVILA, E.; BLAKESLEE, J. J.; BANDYOPADHYAY, A.; KOVALEVA, V.; CARTER, D.; MURPHY, A.; TASAKA, M.; RAIKHEL, N. The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2885-2899, Dec. 2003.
- TANG, D.; INNES, R. W. Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 975-983, Dec. 2002.
- THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 571-599, June 1999.
- WIEDERRECHT, G.; SHUEY, D. J.; KIBBE, W. A.; PARKER, C. S. The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties. **Cell**, Cambridge, v. 48, n. 3, p. 507-515, Feb. 1987.
- ZHU, J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 5, p. 401-406, Oct. 2001.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, June 2002.