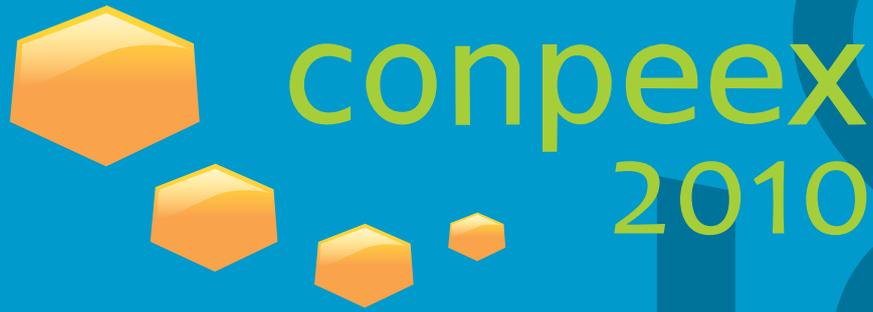


Universidade Federal de Goiás



ANOS

VII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão  
Conhecimento e Desenvolvimento Sustentável

18 a 22 de outubro  
Câmpus Samambaia - Goiânia-Goiás

PIBIC EMBRAPA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Apoio



Realização



## ÍNDICE DE ALUNOS

Aluno	Trabalho
<b>BÁRBARA MÜLLER</b> <b>SALOMÃO DE FARIA</b>	Análise do transcriptoma de <i>Phaseolus vulgaris</i> em resposta ao déficit hídrico
<b>DANIELA DAMASCENO</b> <b>XAVIER FERRO</b>	Efeito de espécies utilizadas no Sistema Plantio Direto na Região Sul sobre o parasitismo e germinação de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

Análise do transcriptoma de *Phaseolus vulgaris* em resposta ao déficit hídrico.

**MÜLLER**, B. S. F.<sup>1,2</sup>; **PAPPAS**, G. J. JR.<sup>3</sup>, **COSTA**, M. M. C.<sup>3</sup>, **PEREIRA**, M. <sup>2</sup>,  
**GUIMARÃES**, C. M.<sup>1</sup>; **ZAMBUZZI-CARVALHO**, P. F.<sup>2</sup>; **SILVEIRA**, R. D. D.<sup>1</sup>,  
**BRONDANI**, C.<sup>1</sup>. & **BRONDANI**, R. P. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia, EMBRAPA Arroz e Feijão, Goiânia, GO;

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular, ICB, UFG, Goiânia, GO;

<sup>3</sup> Laboratório de Bioinformática, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

E-mail: mullerbsf@gmail.com

Palavras-chave: Feijoeiro comum, tolerância a seca, ESTs, leguminosa.

### Introdução:

Os fatores climáticos, como a seca e as altas temperaturas, são alguns dos principais problemas para o cultivo do feijoeiro comum e comprometem a produção em mais de 1,5 milhões de hectares do cultivo no mundo (Teran & Singh, 2002). A deficiência hídrica ocorre geralmente na maioria das regiões produtoras do feijão no Brasil, ocasionando constantes frustrações de safra, sendo a floração a fase mais vulnerável, seguida pelo período do enchimento de grãos (Embrapa, 2010). Em condições de seca, o cultivo do feijoeiro comum sofre severa queda de produtividade, além de se tornar altamente vulnerável ao ataque de doenças.

O feijoeiro comum destaca-se como uma cultura de grande valor nutricional (Broughton *et al.*, 2003), e como alimento acessível às populações de baixa renda. Contrariamente ao observado para culturas de grande interesse internacional, o cultivo do feijão no Brasil ocorre principalmente em pequenas propriedades que utilizam baixo nível tecnológico no processo produtivo, estando inserido em uma cadeia produtiva que provê o sustento de milhares de famílias de pequenos agricultores que, em conjunto, contribuem para o fortalecimento do agronegócio nacional. A demanda constante por cultivares mais produtivas, com melhor qualidade de grão, resistência às principais doenças e tolerantes à estresses

bióticos, estando adaptadas aos variados ambientes de cultivo, tem dado foco ao programa de melhoramento do feijoeiro da Embrapa Arroz e Feijão.

Com o intuito de avançar no conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na tolerância à seca, esse estudo prevê identificação de genes-candidatos envolvidos na resposta ao déficit hídrico, bem como contribuir para o estabelecimento de um banco de sequências-alvo expressas (ESTs) que sejam públicas e enriquecidas para genes diferencialmente expressos nos genótipos BAT 477 (tolerante) e Pérola (suscetível) quando submetidos às condições de presença e ausência do déficit hídrico.

### Material e Métodos:

O experimento para a obtenção do tecido vegetal e RNA foi conduzido em casa de vegetação, da Embrapa Arroz e Feijão, na presença e ausência de déficit hídrico na fase de florescimento e enchimento de grãos das plantas. Foram construídas quatro bibliotecas subtrativas de cDNA, baseadas na Análise de Diferença Representacional (RDA), método que analisa as diferenças nas sequências expressas entre os dois genótipos.

A análise pós-sequenciamento, utilizando o *software* *SisGen* (PAPPAS *et al.*, 2008), baseou-se na seleção das sequências quanto ao tamanho e qualidade, sendo consideradas como válidas aquelas com um número mínimo de 250 pares de base com  $\text{phred} > 20$ , e foi realizada uma análise do nível de redundância das bibliotecas. As sequências válidas foram submetida ao processo de anotação genômica utilizando o algoritmo *BLASTnr* contra diversos bancos de dados (*GenBank*, TAIR - *Arabidopsis thaliana*, *PlantGDB* - *Glycine max* e TIGR *Rice Genome* - *Oryza sativa*). As sequências exclusivas, com o  $E\text{-value} \leq 5$ , foram obtidas a partir de análises *in silico* da presença diferencial entre as bibliotecas. Categorias funcionais, baseadas no *Gene Ontology* – Processos Biológicos foram atribuídas às sequências exclusivas. Foram considerados *clusters* exclusivos sequências com números de *reads*  $\geq 5$ .

## Resultados e Discussão:

O sequenciamento realizado gerou 9.273 sequências, das quais 7.203 foram válidas, totalizando 81% de aproveitamento médio dos clones. A partir de 37% de sequências únicas, o total de *clusters* e *singletons* formados foram de 384 e 174, respectivamente.

As análises *in silico* da presença diferencial de sequências entre as bibliotecas revelaram 69 sequências exclusivas, provavelmente responsáveis pelas diferenças entre os genótipos e sua resposta ao déficit hídrico. Em relação à primeira biblioteca (Pérola – Enchimento de Grãos), 25% das sequências exclusivas se mostraram similares a produtos gênicos envolvidos no ciclo celular; 9% correspondem a genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 8% estão associados à componente do fotossistema; 25% estão relacionados com o metabolismo; 8% a proteínas não classificadas e 25% estão relacionadas com a transcrição. A segunda biblioteca (BAT 477 – Enchimento de Grãos) possui 6% das sequências exclusivas similares às sequências de genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 23% às sequências do fotossistema; 23% às sequências do metabolismo; 3% às sequências de proteínas não classificadas; 39% à síntese de proteínas e 6% à transcrição. Com relação às sequências da terceira biblioteca (Pérola – Florescimento), 59% se mostraram similares às sequências de genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 15% a componente do fotossistema; 7% ao metabolismo; 4% a proteína hipotética; 7% a proteínas não classificadas; 4% a síntese de proteínas e 4% a transporte e proteínas de membrana. Já as sequências da quarta biblioteca (BAT 477 – Florescimento), 13% se mostraram similares às sequências de genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 17% as sequências de componentes do fotossistema; 29% ao metabolismo; 8% a proteínas não classificadas; 8% à sinalização celular; 21% à síntese de proteínas e 4% ao transporte e proteína de membrana.

As sequências exclusivas, obtidas para *Phaseolus vulgaris*, apresentaram maiores índices de homologia com sequências de *Glycine max* (90,25%), seguido por *A. thaliana* (88,75%) e *Oryza sativa* (72,75%). Em relação às 69 sequências exclusivas, 37 foram diferencialmente expressas na variedade tolerante (BAT477), com 19 predominantes na fase de floração e 18 no enchimento de grãos. Das 37

sequências, 17 foram consideradas *clusters* exclusivos, com média do número de *reads* 14 vezes maior em relação aos demais. Já em relação à variedade suscetível (Pérola) 32 sequências foram diferencialmente expressas, sendo 22 predominantes na fase de floração e 10 no enchimento de grãos, além de 12 *clusters* exclusivos serem identificados de acordo com o critério de estrigência adotado.

Em relação às 69 sequências exclusivas, 40% apresentaram similaridade com sequências obtidas sob condições de estresse, permitindo inferir que o procedimento adotado foi satisfatório quanto à filtragem para genes responsivos ao déficit hídrico. Foram identificadas regiões genômicas contendo genes de grande interesse econômico, como por exemplo, fragmentos relacionados às proteínas reprimidas por auxinas, relacionados às respostas a desidratação e à resposta ao estresse oxidativo.

### **Conclusão:**

Um conjunto de sequências-alvo diferencialmente expressas nas condições de déficit hídrico foi identificado, a partir de experimento com genótipos de feijoeiro tolerante e suscetível ao estresse, para as quais foram derivados oligonucleotídeos iniciadores visando a busca por SNPs entre os parentais de uma população para tolerância à seca, seguido por mapeamento e análise de QTLs.

Para os ESTs cujo processo de anotação resultou na identificação de sequências com similaridade significativa a genes envolvidos em resposta a estresses, assim como para ESTs sem função definida, porém com número de *reads*  $\geq 5$ , será conduzida uma análise de qRT-PCR, objetivando a validação e quantificação da expressão gênica.

Todas as sequências transcritas exclusivas geradas para *Phaseolus vulgaris* serão disponibilizadas e compartilhadas através de bancos de dados públicos, tornando-as acessíveis para fins de pesquisa em âmbito mundial.

### Referências Bibliográficas:

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P., VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 252, p. 55-128, 2003.

EMBRAPA - Sistemas de produção do feijoeiro, Cultivo do Feijoeiro comum, Importância Econômica e Clima. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijao/feijao.htm>>. Acesso em: 06 de setembro de 2010.

GEPTS, P.; BEAVIS, W.D.; BRUMMER, E.C.; SHOEMAKER, R.C.; et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiol**, v. 137, p. 1228-1235, 2005.

PAPPAS, G. J. Jr.; MIRANDA, R.P.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R.C.; COSTA, M.M.C. SisGen: A CORBA Based Data Management Program for DNA Sequencing Projects. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 5109, p. 116-123, 2008.

TÉRAN, H.; SINGH, S. P. Comparison of Sources and Lines Selected for Drought Resistance in Common Bean. **Crop Science**, v.42, p. 64-70, 2002.

**Recursos financeiros:** *Macroprograma Embrapa/Monsanto e CNPq.*

## **Efeito de espécies utilizadas no Sistema Plantio Direto na Região Sul sobre o parasitismo e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum***

**FERRO**, Daniela Damasceno Xavier<sup>1</sup>; **LOBO JUNIOR**, Murillo<sup>2</sup>

1- Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO, CEP74001970. E-mail: danieladamasceno87@hotmail.com

2- Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462 km 12, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP 75375-000. E-mail: murillo@cnpaf.embrapa.br

Palavras-chave: mofo-branco, cereais de inverno, rotação de culturas, apotécios.

### **INTRODUÇÃO**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é o agente causal do mofo branco e um patógeno de ampla ocorrência em todo o mundo, com pelo menos 408 espécies de plantas hospedeiras (BOLAND & HALL, 1994). O patógeno sobrevive no solo por meio de escleródios (estruturas de resistência) que se acumulam com o plantio de espécies suscetíveis. Estima-se que a severidade da doença é proporcional à população de escleródios no solo e, por este motivo, as estratégias de manejo do mofo branco devem incluir métodos para a redução do inóculo inicial do patógeno.

Exudatos liberados pelas raízes das plantas podem influenciar a atividade dos patógenos habitantes do solo (BAIS et al., 2006), de forma que a rotação de culturas com espécies não hospedeiras deve ser planejada cuidadosamente para o manejo adequado do mofo branco, visando a diminuição do inóculo inicial de *S. sclerotiorum*, por meio do parasitismo e do esgotamento de suas estruturas de resistência. Pouco se sabe sobre a influência de espécies como cereais de inverno e espécies hospedeiras cultivadas na Região Sul do Brasil em Sistema Plantio Direto, sobre a germinação de escleródios. Por este motivo, este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes espécies adaptadas para cultivo sob baixas temperaturas no parasitismo e germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido na Embrapa Arroz e Feijão, em S. Antônio de Goiás, GO, com tratamentos compostos por poáceas (trigo abalone, centeio cv. BRS Serrano, aveia branca, triticales cv. IPR 111, aveia preta comum, trigo marfim,

azevém, aveia preta cv. BRS Neblina, arroz cv. BRS curinga, triticale cv. BRS Ulisses), leguminosas, (tremoço branco, ervilhaca comum, feijão comum cv. Pérola) e uma Crucífera (nabo forrageiro). As espécies foram semeadas em proporção à densidade de sementes recomendada para plantios em campo, em vasos com 5 kg de latossolo vermelho com 2g de 4-30-16 + Zn / kg solo. Após 25 dias em casa de vegetação, os vasos foram transferidos para sala climatizada com temperatura média de 22,5° C e umidade relativa próxima a 65%. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. O solo foi mantido sempre úmido, próximo à capacidade de campo.

Logo após o plantio 100 escleródios foram distribuídos de forma uniforme sobre o solo de cada vaso. Estes escleródios foram previamente desinfestados com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2% (ambos por 1 minuto), e enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. Fez-se adubação de cobertura com uréia aos 20 dias. Para evitar a dispersão dos escleródios com a irrigação dos vasos, a irrigação foi feita cuidadosamente adicionando-se a água através de tubetes vasados no seu fundo e colocados no centro dos vasos. Foram avaliados o número de escleródios parasitados, escleródios germinados, e apotécios formados aos 30, 40, 48 e 58 dias após o plantio (DAP). Plantas sintomáticas foram levadas ao laboratório para isolamento e identificação do patógeno. Os resultados foram submetidos à análise de variância (5%).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O parasitismo de escleródio e a germinação de escleródios ocorreu em todos os tratamentos. O número de escleródios parasitados variou durante o experimento nos diferentes tratamentos, à exceção de *B. brizantha* cv. Marandu e do trigo marfim. Aos 30 e 40 DAP foi observada maior quantidade de escleródios parasitados no nabo forrageiro e no feijão 'Pérola'. A menor proporção de parasitismo nas avaliações finais de quase todos os tratamentos foi explicada pela morte seguida por apodrecimento dos escleródios, colonizados anteriormente por fungos e bactérias do solo (Figura 1). A germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* foi iniciada aos 40 DAP, progredindo nas avaliações aos 48 e 58 DAP. Aos 58 DAP, pôde-se observar que o maior número de escleródios germinados e de apotécios formados ocorreu nos tratamentos com arroz BRS Curinga, tremoço branco, feijão cv. Pérola e azevém (Figuras 2 e 3). Em posição intermediária, ficaram os

tratamentos com triticale, aveias, trigo abalone e centeio. A menor quantidade de escleródios germinados carpogenicamente e de apotécios foi observada no nabo forrageiro, observados somente aos 58 DAP. Os resultados demonstraram o potencial de uso do arroz 'BRS Curinga' e do azevém para seu cultivo em campo, como espécies não hospedeiras de *S. sclerotiorum* com capacidade para estimular a germinação de escleródios e o esgotamento de suas reservas, conforme observado por Civardi et al (2009).

Mesmo sem o período de molhamento foliar necessário para a ocorrência do mofo branco nas plantas, verificou-se também que espécies hospedeiras como o nabo forrageiro, o feijão comum e o tremoço branco estimulam a germinação de escleródios, provavelmente pela liberação de exudatos radiculares no solo. No caso do nabo forrageiro, somente esta espécie apresentou sintomas de doença confirmada posteriormente como causados por *S. sclerotiorum*. Observou-se que diversas plantas desta espécie foram severamente atacadas pelo patógeno com sintomas de apodrecimento próximo ao colo, considerado como resultado da germinação miceliogênica dos escleródios (sem a interferência de apotécios), endossando recomendações de que esta espécie não é adequada à rotação de culturas com o feijão.

## CONCLUSÕES

1. O arroz BRS Curinga pode estimular a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, e tem potencial para uso na desinfestação de solos com o patógeno.
2. Espécies hospedeiras como *S. sclerotiorum* como o feijão comum e o tremoço branco estimulam a germinação carpogênica dos escleródios.
3. O nabo forrageiro induziu maior parasitismo de escleródios e a germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology** v.57, p.233–66, 2006.

BOLAND, G.J. & HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology** v.16, p.93-108, 1994.

CIVARDI, E. A.; GÖRGEN, C. A.; LOBO JUNIOR, M.; BROD, E.; GODOY, E. R.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V. Efeito da densidade de *Brachiaria ruziziensis* na germinação carpogênica de escleródios em área naturalmente infestada por *Sclerotinia sclerotiorum*. In: 5º Congresso Brasileiro de Soja; Mercosoja 2009, 2009, Goiânia. **Anais....** Londrina: Embrapa Soja, 2009.

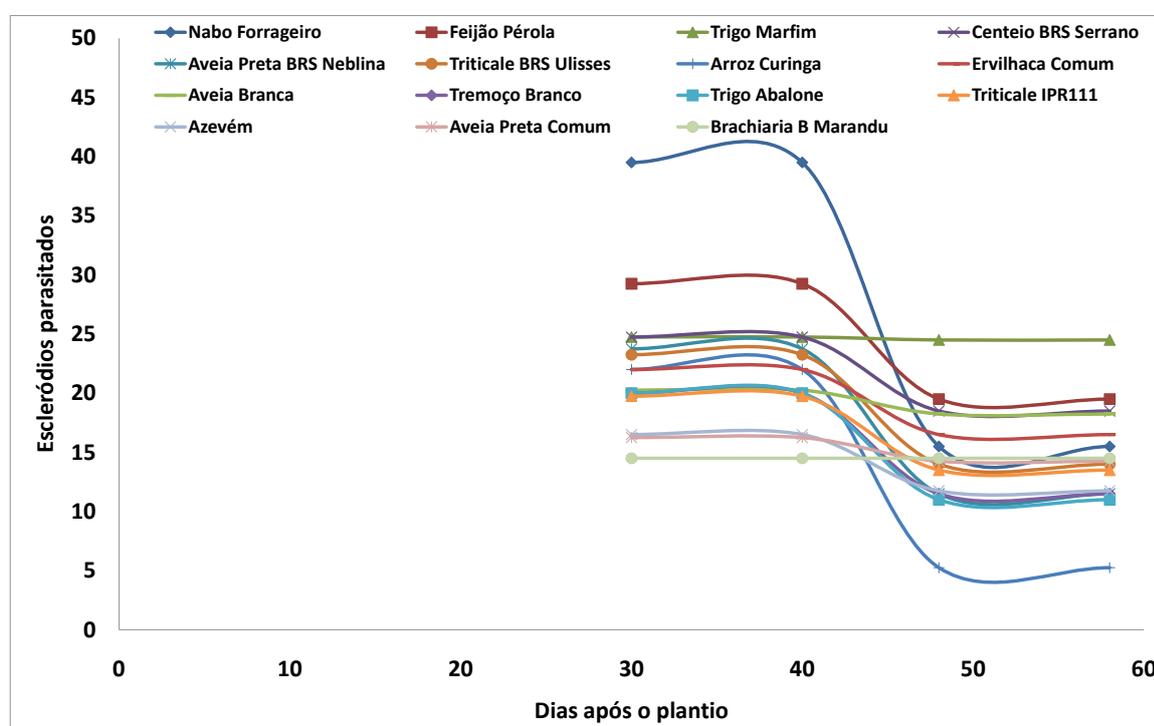


Figura 1. Número de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitados por microrganismos habitantes do solo, em vasos cultivados com diferentes espécies utilizadas na Região Sul do Brasil, em Sistema Plantio Direto.

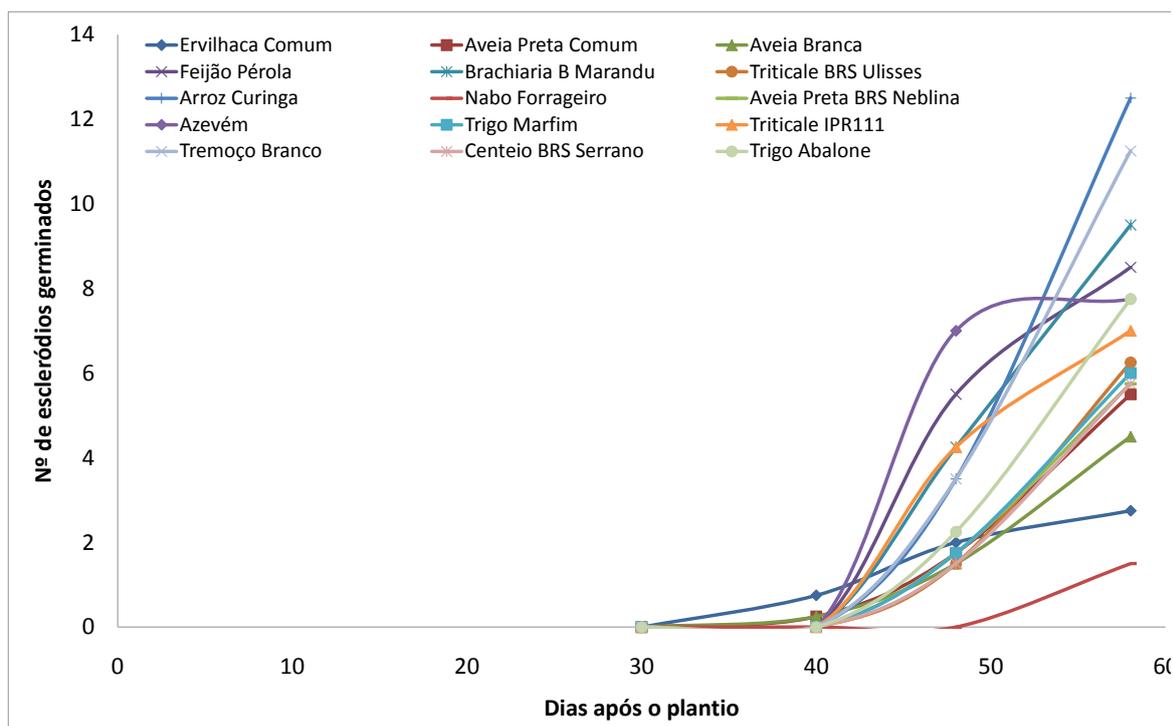


Figura 2. Número de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* germinados, em vasos cultivados com diferentes espécies utilizadas na Região Sul do Brasil, em Sistema Plantio Direto.

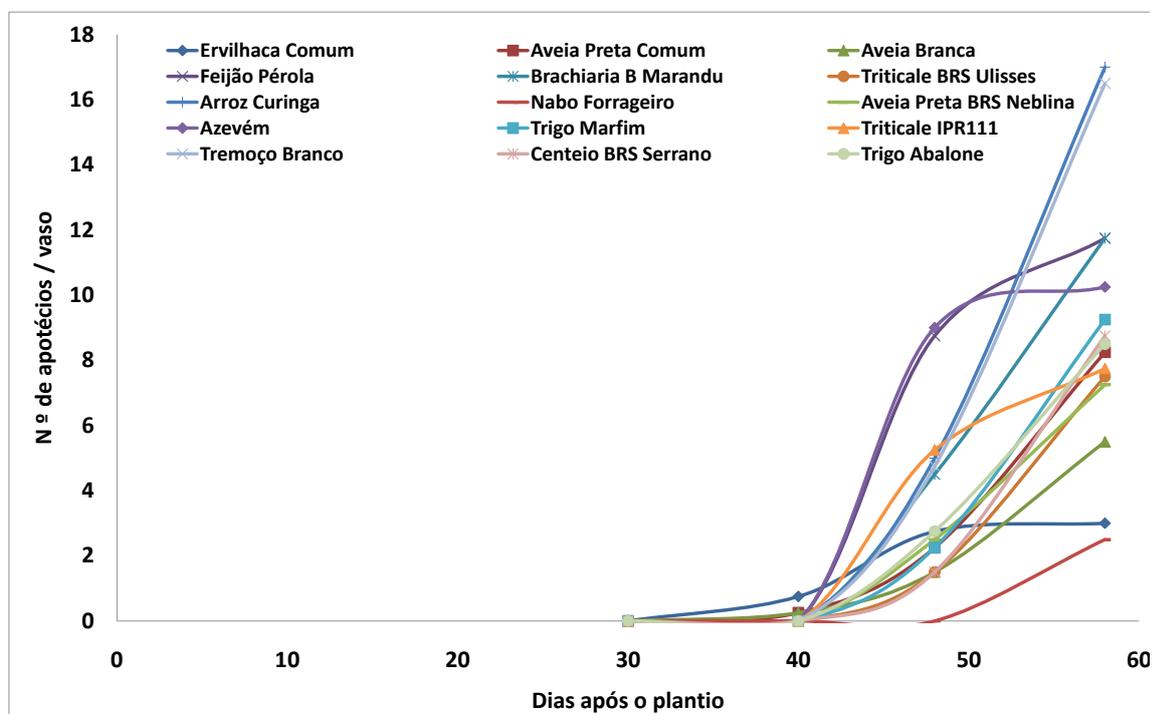


Figura 3. Número de apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* formados em vasos cultivados com diferentes espécies utilizadas na Região Sul do Brasil, em Sistema Plantio Direto.