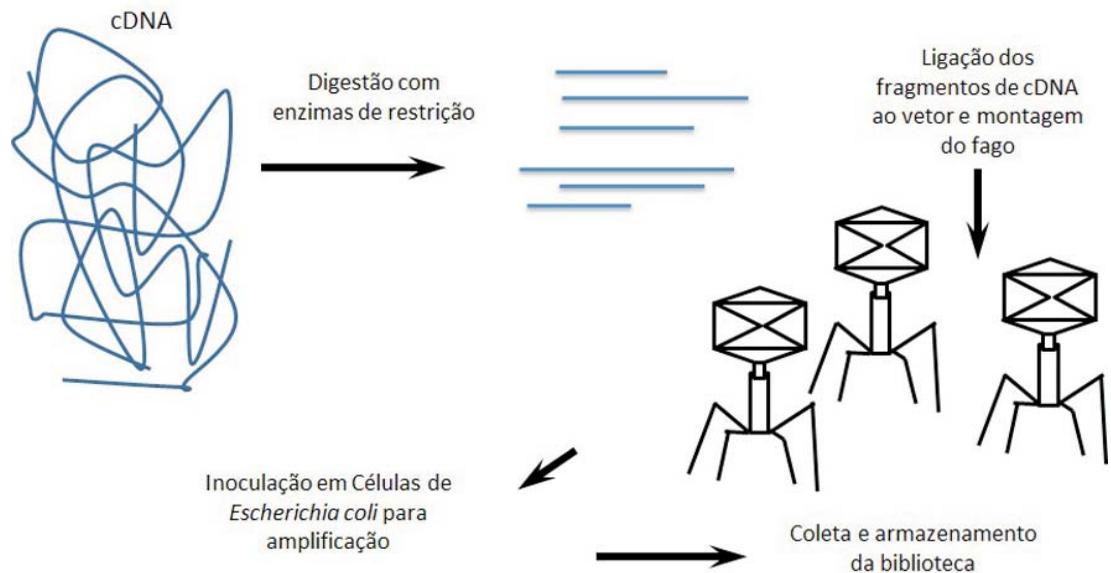


Construção de uma biblioteca de cDNA de nódulos de caupi e isolamento de genes expressos em condições de estresse térmico



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 68

Construção de uma biblioteca de cDNA de nódulos de caupi e isolamento de genes expressos em condições de estresse térmico

Jean Luiz Simões de Araújo
Márcia Soares Vidal
Helder Anderson Pinto da Silva
Péricles de Souza Galisa
Márcia M. N. P. Margis

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Revisão de texto: Cláudia P. Jantalia, Vera L. D. Baldani, José

Ivo Baldani, Kátia R. dos S. Teixeira, Luis H. de B. Soares

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Jean Luiz Simões de Araújo

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

CONSTRUÇÃO e triagem de uma biblioteca de cDNA de nódulos de caupi submetidos a estresse térmico / Jean Luiz Simões de Araújo et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 23 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 68).

ISSN 1676-6709

1. Bacteriófago. 2. Feijão. 3. Expressão gênica. I.

Araújo, Jean Luiz Simões de. II. Vidal, Márcia Soares. III. Silva,

Helder Anderson Pinto da. IV. Galisa, Péricles de Souza. V.

Margis, Márcia M. N. P. VI. Embrapa Agrobiologia. VII. Série.

572.865 CDD 23 ed.

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 6 |
| Introdução | 7 |
| Material e Métodos | 8 |
| Construção da Biblioteca de cDNA em bacteriófago | 8 |
| Empacotamento do cDNA | 9 |
| Titulação da biblioteca de cDNA | 9 |
| Amplificação da biblioteca de cDNA primária | 10 |
| Seleção de clones em placas de Petri | 11 |
| Preparação de gel vertical de agarose em tampão alcalino | 12 |
| Resultados e Discussão | 12 |
| Construção da Biblioteca de cDNA a partir de RNA de nódulos de caupi submetidos a altas temperaturas | 12 |
| Triagem da biblioteca de cDNA | 13 |
| Análise das sequências do DNA dos clones selecionados na biblioteca | 17 |
| Conclusão | 19 |
| Referências Bibliográficas | 20 |

Construção de uma biblioteca de cDNA de nódulos de caupi e isolamento de genes expressos em condições de estresse térmico

*Jean Luiz Simões de Araújo*¹

*Márcia Soares Vidal*¹

*Helder Anderson Pinto da Silva*²

*Péricles de Souza Galisa*³

*Márcia M. N. P. Margis*⁴

Resumo

Uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) foi construída a partir de RNA mensageiro extraído de nódulos de caupi submetidos a altas temperaturas. O cDNA foi clonado no vetor UniZap XR e utilizado para geração de bacteriófagos artificiais, por meio de uma reação de empacotamento. Esses bacteriófagos foram inoculados em células de *Escherichia coli* para criação da biblioteca primária com aproximadamente 10.000 clones. Após uma etapa de amplificação *in vivo* a biblioteca atingiu o título de 126×10^6 pfu (plaque-forming units).ml⁻¹. Duas estratégias foram utilizadas para a triagem da biblioteca: 1) sondas de fragmentos de cDNA de genes específicos; 2) cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de nódulos de caupi submetidos ao estresse térmico. Para cada tipo de sonda foi utilizada um total de 38.000 pfu do bacteriófago, sendo isolado um total de 56 clones. A análise de similaridade de sequência do cDNA desses clones mostrou homologia com genes relacionados a diferentes funções metabólicas. Além disso, o padrão de expressão de 6 genes, avaliado por Northern blot, sugere a participação desse genes na resposta dos nódulos de caupi ao estresse térmico.

¹ Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Dr. em Genética. BR 465, km 7, Seropédica, RJ. E-mail: jean@cnpab.embrapa.br, marcia@cnpab.embrapa.br.

² Mestrando em Biotecnologia Vegetal (PBV) - UFRJ. E-mail: helderanderson@ufrj.br.

³ Doutorando em Ciências dos Solos - UFRRJ. E-mail: periclesgalisa@yahoo.com.br.

⁴ Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Depart^o Genética.

Construction of cowpea nodules cDNA library and screening of genes expressed under heat stress

Abstract

A cDNA (complementary DNA) library was constructed from messenger RNA extracted from cowpea nodules under heat stress. The cDNA cloned into the vector UniZap XR was used to assembly an artificial bacteriophage. This bacteriophage was used to infect Escherichia coli and create a primarily library with 10.000 clones. After one round of amplification the library title achieved 126×10^6 pfu (plaque-forming units).ml⁻¹. Two different strategies were used to screen the library: 1) probes from cDNA fragments of specific genes; 2) cDNA synthesized from total RNA extracted from cowpea nodules under heat stress. A total of 38,000 pfu of bacteriophage was used to each probe type and, 56 clones was isolated. The similarity analysis of cDNA sequence showed homology with genes related to different metabolic functions. Furthermore, the expression patterns of 6 genes, assessed by Northern blot analysis, suggest that these genes can participate in cowpea nodules response to heat stress.

Keywords: Bacteriophage, Full-length cDNA clones, Differential Expression, Amplification, abiotic stress, Vigna unguiculata.

Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas é o resultado da interação de um grupo específico de bactérias (microsimbionte), denominadas de maneira genérica de rizóbio e a planta hospedeira (macrossimbionte) tendo como consequência a formação do nódulo, geralmente nas raízes, onde ocorre o processo de FBN. Diversos fatores ambientais como disponibilidade de água e altas temperaturas nas camadas superficiais do solo limitam o processo de nodulação. Apesar do limite de tolerância para o funcionamento do processo de FBN estar entre 30°C (GRAHAM e HALLIDAY, 1977) e 33°C (BARRIOS et al., 1963), decréscimos na taxa de fixação de nitrogênio já foram observados a partir de 28°C (PIHA e MUNNS, 1987). Em condições tropicais a temperatura do solo alcança com frequência 38°C (MOROTO et al., 1990) e tem sido observado nestas condições que as plantas sob FBN sofrem mais os efeitos negativos das altas temperaturas do que aquelas que recebem adubos nitrogenados. Este efeito pode ser observado mesmo quando as plantas são inoculadas com *Rhizobium tropici*, que tem capacidade de crescer sob altas temperaturas (40°C) em meio de cultura (MERCANTE, F. M., 1993). A exposição de plantas de feijão a 38°C durante seis dias pode causar a ruptura da membrana peribacteriana dos nódulos, eliminando totalmente a atividade da nitrogenase, enzima responsável pela FBN (HERNANDEZ-ARMENTA et al., 1989). Piha e Munns (1987) mostraram que a simbiose do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é mais tolerante ao efeito das altas temperaturas do que aquela formada com o feijoeiro. O caupi é uma leguminosa caracterizada principalmente pelo seu amplo potencial adaptativo, sendo capaz de suportar condições ambientais adversas (EHLERS e HALL, 1997), o que a torna uma espécie modelo para investigações das respostas moleculares vegetais a estresses abióticos (IUCHI et al., 1996). Desta forma, o isolamento e a caracterização de genes expressos nos nódulos de caupi em condições de estresse térmico pode auxiliar o entendimento dos mecanismos moleculares que atuam durante o estresse na simbiose.

Nos últimos anos uma grande variedade de técnicas moleculares baseadas em PCR e sequenciamento foi desenvolvida para a identificação dos genes

diferencialmente expressos. Essas técnicas potencialmente simplificaram a identificação e o isolamento de genes expressos em uma condição específica. Dentre estas se destacam o *Differential Display* (LIANG e PARDEE, 1992), *fingerprinting* de RNA utilizando primers randômicos RAP-PCR. (WELSH et al, 1992), cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1996) e mais recentemente o sequenciamento de RNA (RNA-seq) (WANG et al., 2009). Tais técnicas apresentam um grande potencial para a identificação de genes diferencialmente expressos nas mais distintas condições. No entanto, na maioria dos casos, apenas parte do cDNA de interesse pode ser obtido havendo ainda a necessidade da utilização de outra metodologia para obtenção do cDNA completo, contendo por exemplo a região 3' não traduzida. Neste caso, a construção e a triagem de bibliotecas de cDNA permite a geração de um banco de clones contendo o cDNA completo para os genes induzidos em uma condição específica.

Material e Métodos

Construção da Biblioteca de cDNA em bacteriófago

A biblioteca de cDNA foi construída a partir de RNAs mensageiros (RNAm) isolados nódulos de caupi submetidos a altas temperaturas utilizando o "cDNA Synthesis Kit" (Stratagene, cat. nº 200400), incluindo o "ZAP-cDNA Synthesis Kit" (Stratagene, cat. nº 200401) e o "ZAP-cDNA Gigapack II Cold Cloning Kit" (Stratagene, cat. nº 200450). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 5 mg de RNA poli-A separado do RNA total utilizando o kit "PolyATtract® mRNA Isolation System III" (Promega, cat. nº. Z5300) de acordo com especificações do fabricante. O RNAm foi utilizado como molde para a síntese de cDNA (DNA complementar) de acordo com as recomendações do kit para síntese de cDNA, no entanto, foi utilizado nucleotídeo CTP metilado (Met-dCTP) para que não ocorresse a digestão do cDNA sintetizado na fase de preparação para clonagem no vetor. Todas as soluções e reações foram preparadas em água previamente tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Paralelamente foi realizada uma reação controle com 5 µl da síntese da primeira fita de cDNA e 0,5 µl de [α -³²P]-ATP. As duas reações foram incubadas por 1 h a 42 °C, a reação não radioativa foi utilizada para síntese da segunda fita de cDNA após

incubação por 2,5 h a 16°C. As extremidades do cDNA foram "aparadas" através da adição de 23 µl da mistura de dNTP, 2 µl de DNA polimerase *Pfu* e incubação por 72°C por 2 h. O material foi tratado com 200 µl de fenol/clorofórmio e precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio (3M) e dois volumes de etanol 100% (v/v). Ao precipitado foram adicionados 9 µl da solução de adaptadores *EcoRI* e incubados a 4°C por 30 minutos. Uma alíquota de 1 µl foi utilizada como controle da reação de síntese da segunda fita, que juntamente com a alíquota controle da reação de síntese da primeira fita foram analisados em gel de agarose em tampão alcalino. O cDNA foi digerido com a enzima de restrição *XhoI* (120 U.µl⁻¹) por 1,5 h a 37°C, precipitado e ressuspenso em 14 µl e quantificado por comparação com amostras de concentrações conhecidas. Uma alíquota de 100 ng desse cDNA foi utilizada para a reação de ligação ao vetor UniZap XR (1µg) em uma reação a 4°C por 2 dias. Para essa reação foi também feito um controle onde foi ligado ao vetor um inserto teste (0,4 µg) fornecido pelo próprio kit.

Empacotamento do cDNA

O cDNA ligado foi empacotado segundo o protocolo do kit "Gigapack® III Gold packaging extract" (Stratagene, cat. nº 200203). A reação de empacotamento é uma etapa fundamental e corresponde a "montagem" de um fago artificial contendo o cDNA clonado no vetor UniZap XR. Para a reação de empacotamento foi adicionado ao cDNA ligado da etapa anterior, o extrato de empacotamento e incubado 2 horas a 22°C. O extrato de empacotamento contém todas as proteínas necessárias para a formação do capsídeo (o invólucro do fago). Após o período a reação foi paralisada adicionando-se 500 µl de tampão SM (0,1 M de NaCl; 0,05 M de Tris-HCl, pH 7,5; 0,01 % de gelatina; 0,08 M de MgCl₂·7H₂O). Como controle foi realizado um ensaio paralelo utilizando o DNA do bacteriófago selvagem fornecido pelo kit.

Titulação da biblioteca de cDNA

A biblioteca construída foi titulada a partir da utilização do bacteriófago para a infecção de *Escherichia coli* estirpe XL1-Blue MRF'. Para a titulação da ligação controle foi utilizada a estirpe VCS257. As bactérias foram crescidas em meio LB líquido suplementado com 10 mM de MgSO₄ e 0,2%

(p/v) de maltose até atingir uma densidade ótica a 600 nm ($D.O._{600}$) em torno de 1. A cultura foi centrifugada a 500 x g por 10 min, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 10 mM de $MgSO_4$ estéril de forma a atingir 0,5 de $D.O._{600}$. A 200 μ l dessa solução foi adicionado 1 μ l da solução contendo o bacteriófago empacotado diluído 1:5.000, 1:50.000, 1:500.000. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos para permitir a aderência do bacteriófago às células hospedeiras, e em seguida, foram adicionados 3 ml de meio NZY "top agar" (meio NZY preparado com agarose 0,7%) pré-aquecido a 48°C, contendo 15 μ l de IPTG (0,5 M), 50 μ l de X-gal [250 mg/mL (em DMF)]. Esta mistura foi então colocada como uma camada superior em uma placa de Petri contendo meio NZY sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e analisadas no dia seguinte. A quantificação do número de placas de lise foi realizada através da utilização da seguinte fórmula:

$$\text{pfu (plaque - forming units)/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de placas de lise} \times \text{diluição da amostra} \times 1000}{[\text{vol. da amostra de vírus } (\mu\text{l})]}$$

Amplificação da biblioteca de cDNA primária

Após titular a biblioteca, a mesma foi dividida em duas alíquotas de 250 μ l, as quais foram adicionadas a 600 μ l de células de *E. coli* (estirpe XL1-Blue MRF⁺) com 0,5 $D.O._{600}$ em 10 M de $MgSO_4$. As misturas foram então incubadas a 37°C por 15 minutos. Após esse período foram adicionadas a 6,5 ml de meio NZY top agar pré-aquecido a 48°C e distribuídas como uma camada superior em placas contendo meio NZY sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 8 h. Ao final desse período, 8 ml de tampão SM foram adicionados às placas que foram então mantidas sob agitação leve a 4°C por 16 h. No dia seguinte o tampão foi retirado e para recuperar totalmente os bacteriófagos foram adicionados mais 2 ml de tampão SM em cada placa; após leve agitação, a solução foi recolhida e misturada com os 8 ml iniciais. A esse material contendo a biblioteca amplificada (20 ml) foi adicionado clorofórmio para uma concentração final de 5% (v/v). A mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, centrifugada a 500 x g por 10 min e após titulação foi armazenada a 4°C ou -80°C em alíquotas de 500 μ l após adição de DMSO para uma concentração final de 7% (v/v).

Seleção de clones em placas de Petri (triagem da biblioteca)

Para a seleção dos clones contendo o cDNA de genes expressos nos nódulos submetidos a altas temperaturas foi utilizado o procedimento descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Como sonda, foram utilizados fragmentos derivados de transcritos (FDTs obtidos de experimentos de cDNA-AFLP, ou a cDNA sintetizado a partir de RNAm extraído de nódulos submetidos a estresse térmico, ambos marcados com radioatividade ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$). O mesmo procedimento utilizado para a titulação da biblioteca foi empregado para preparação da placas para hibridização. No entanto, para a triagem foi utilizada uma quantidade de fagos da biblioteca amplificada suficiente para fornecer 3.800/pfu por placa de Petri de 150 mm. Um total de 38.000 pfu (dez placas) foi utilizado para cada sonda. Após crescimento por 8 hs a 37°C o DNA dos fagos contido nas placas de Petri foi transferido para uma membrana de náilon. Para cada placa foram utilizadas duas membranas sendo ambas utilizadas para hibridização com a sonda radioativa. O DNA transferido para as membranas foi desnaturado, neutralizado, fixado e hidridizado a 65°C durante 12 a 14 hs. Após esse período, as membranas foram lavadas durante 30 minutos em solução 2X de SSC e 0,1% de SDS e, durante 30 minutos, em solução 1X de SSC e 0,1% de SDS ambas a 65°C. Após a última lavagem as membranas foram secas ligeiramente, e mantida junto a um filme de raio-X a -70°C por um período de 2 a 4 dias, de acordo com a intensidade do sinal radioativo. Após a revelação do filme as placas de lise que apresentaram sinal de hibridização nas duas membranas foram selecionadas para a segunda triagem. Nesse caso a região da placa contendo a placa de lise de interesse foi removida da placa de Petri, com o auxílio de uma ponteira para pipeta automática, dissolvida em tampão (500 μl SM) e 250 μl dessa solução foram utilizados para a segunda triagem. Esse mesmo procedimento foi utilizado para realização da terceira triagem.

Após a terceira triagem das placas de lise de interesse os DNAs dos bacteriófagos contendo os cDNAs de interesse foram transformados em plasmídeo através da técnica de excisão *in vivo*. Este recurso fornecido

pelo sistema Zap-cDNA permite a obtenção do plasmídeo pBluescript SK (-) a partir do DNA do fago. Para o ensaio de excisão *in vivo* foram utilizados 250 µl de cada fago selecionado, 200 µl de células de *E. coli* estirpe XL1-Blue MRF' (D.O.₆₀₀ = 1) e 1 µl de fago "helper ExAssist" (> 1x10⁶ pfu.µl⁻¹). A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos, 3 mL de meio BL líquido foram adicionados e a mistura então incubada a 37°C por 2,5 a 3 h ou durante 16 h. No dia seguinte o material foi aquecido a uma temperatura entre 65-70°C por 20 minutos e centrifugado a 1.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante contendo o pBluescript fasmídeo na forma de partículas filamentosas de fago foi utilizado para inoculação de células de *E. coli* estirpe SOLD a 1 de D.O.₆₀₀ preparada conforme descrito anteriormente. A mistura foi incubada a 37°C por 15 min e 200 µl da mistura foram colocados em placas com meio LB contendo ampicilina (50 µg.ml⁻¹). As colônias presentes após crescimento por 16 h possuem o plasmídeo pBluescript em dupla fita com o inserto de cDNA clonado e foram selecionadas para posterior caracterização do cDNA clonado.

Preparação de gel vertical de agarose em tampão alcalino

O gel de agarose alcalino foi utilizado para avaliar a faixa de tamanho do cDNA sintetizado (primeira e segunda fitas). Como a espessura típica do gel de agarose poderia provocar uma dispersão na emissão de radioatividade e prejudicar a interpretação do auto-radiograma, um gel de agarose (1%) em tampão alcalino com 1,5 mm de espessura foi preparado numa cuba normalmente utilizada para preparação de géis de poliacrilamida. As amostras controle da síntese da primeira e segunda fita de cDNA foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 3 hs a 100 mA ou até o corante azul de bromofenol atingir o terço final do gel. O gel foi seco e exposto junto a um filme de raio-X por 48 hs.

Resultados e Discussão

Construção da Biblioteca de cDNA a partir de RNA de nódulos de caupi submetidos a altas temperaturas

A Fig. 1A mostra o resultado da síntese da primeira e da segunda fita de cDNA. O cDNA obtido aparece na metade superior do gel, indicando que a

maioria dos cDNA apresenta um tamanho superior a 500 pares de base (pb). Além disso, após a construção da biblioteca, nove clones foram selecionados ao acaso para verificar o tamanho médio de cDNA clonado, sendo que sete deles apresentaram inserto de cDNA maior que 500 pb, confirmando que houve uma reação de síntese de cDNA de boa qualidade (Fig. 1B).

A titulação da biblioteca a partir da inoculação do bacteriófago em *E. coli* (estirpe XL1-Blue MRF⁺) mostrou que número de clones da biblioteca primária ficou em torno de 10.000, no entanto, após uma rodada de amplificação a biblioteca atingiu o título de 126×10^6 pfu.ml⁻¹.

Triagem da biblioteca de cDNA

A construção da biblioteca de cDNA em fago permitiu o isolamento do cDNA completo de diversos genes induzidos por altas temperaturas em nódulos de caupi (Tab. 1).

A Fig. 2 mostra um exemplo do resultado obtido para as três etapas de triagem da biblioteca. Após a terceira triagem os clones considerados positivos foram utilizados para a reação de excisão *in vitro*. A Fig. 3A mostra a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* do DNA

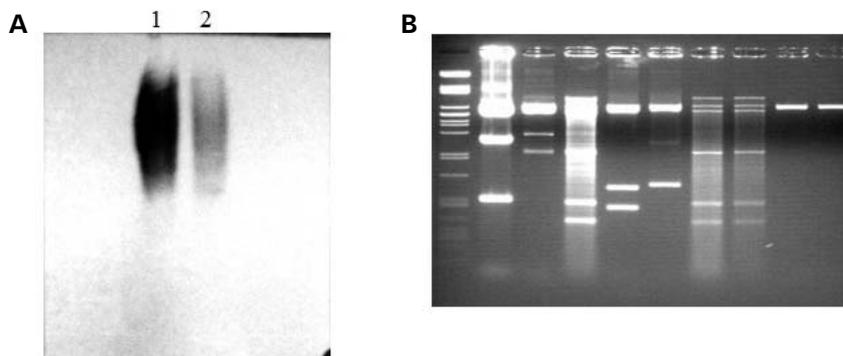


Fig. 1. A) Auto-radiografia de gel de Agarose 1% alcalino. Coluna 1: 5 μ l da reação de síntese de cDNA primeira fita; coluna 2: 1 μ l da reação de síntese da segunda fita cDNA. **B)** Gel de agarose 1% com DNA plasmidial extraído de clones aleatoriamente selecionados na biblioteca de cDNA e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*.

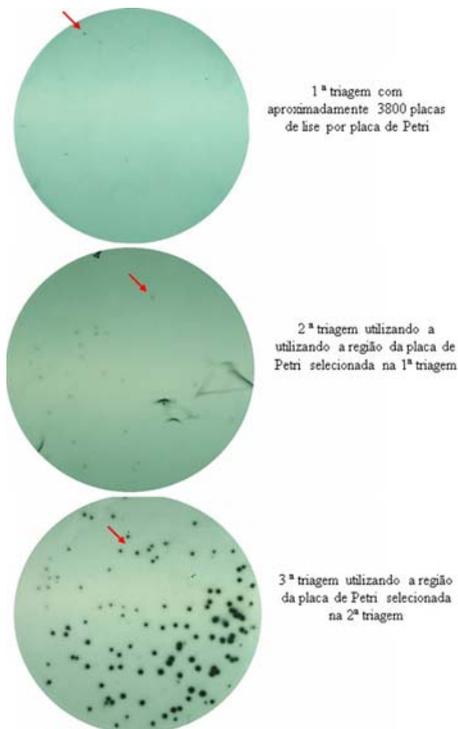
Tabela 1. Similaridade de sequências dos clones selecionados da biblioteca de cDNA construída a partir de RNA extraídos de nódulos de caupi submetidos a altas temperaturas.

| Clone | Similaridade de sequência utilizando o programa BLAST | Valor E |
|-------|--|---------|
| 24.2A | Leghemoglobina II (<i>Vigna unguiculata</i>) | 1e-10 |
| 4.1A | Sem sequência similar | |
| 14.1A | Sem sequência similar | |
| 19.1A | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 3e-62 |
| 2.1A | Cadeia delta da ATP sintase | 5e-17 |
| 1.3B | Sem sequência similar | |
| 14.2B | Proteína de Choque térmico 17.7 kDa | 3e-40 |
| 8.2B | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 3e-40 |
| 4.1B | Gmhspl8.5-C (classe I) | |
| 10.1B | Gmhspl8.5-C kDa | 6e-61 |
| 13.1B | Proteína 60S ribossomal | 1e-34 |
| 8.1A | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | e-176 |
| 8.1B | Carboxikinase fosfoenolpiruvato | |
| 7.1B | Sem sequência similar | |
| 1.3A | Precursor de Nodulina 30 (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | 1e-20 |
| 19.1B | Leghemoglobina (<i>Vigna unguiculata</i>) | 6e-10 |
| 23.2A | Nodulina 30 (<i>P. vulgaris</i>) | 2e-21 |
| 23.1B | Leghemoglobina II (LbII) (<i>V. unguiculata</i>) | 5e-43 |
| 24.3A | Nodulina 22 (<i>Glycine max</i>) | 5e-43 |
| 17.1B | Proteína de Choque térmico 18.5-C kDa (classe I) | 9e-94 |
| 12.2A | Precursor da Nodulina C51 (<i>G. max</i>) | |
| 16.1B | Ciclina B Proteína quinase Serine/treonina (<i>C. longicaudatus</i>) | 2e-20 |
| 14.1 | Proteína de choque térmico 17.3 (classe I de <i>G. max</i>) | 8e-26 |
| 6.2B | Fator de ribosilação de ADP (<i>Capsicum annum</i>) | 3e-64 |
| 4.2B | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 0.0 |
| 22.2B | Leghemoglobina I (<i>V. unguiculata</i>) | 1e-16 |
| 6.1B | Fator 2 de ribosilação de ADP | 1 e-17 |
| 21.1B | Proteína de Choque térmico 17.5-E (GmHSP17.5-E) | 5e-83 |
| 12.1B | Proteína de Choque térmico 18.5-C (GmHSP classe I) | 1e-42 |
| 4.2A | Nodulina-30 (<i>P. vulgaris</i>) | 5e-14 |
| 16.1A | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 8e-21 |
| 1.1B | Proteína de Choque térmico 18.5-C (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 2e-33 |
| 22.1B | Proteína de Choque térmico 18.5 C (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 2e-15 |
| 15.2A | Nodulina-30 (<i>P. vulgaris</i>) | 5e-14 |
| 10.1A | Proteína de Choque térmico 18.5 (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 8e-14 |
| 22.2A | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 9e-38 |
| 20.2A | Precursor da Nodulina precoce 75 | |
| 23.3A | Proteína de Choque térmico 17.0 (hsp17.0) | 9e-38 |
| 10.1B | Proteína de Choque térmico 18.5 (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 7e-12 |
| 3.1A | Proteína de Choque térmico 18.5 (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 5e-08 |
| 3.1B | Proteína de Choque térmico 17.3 (GmHSP17.3 kDa classe I) | 3e-44 |

Tabela 1. Similaridade de sequências dos clones selecionados da biblioteca de cDNA construída a partir de RNA extraídos de nódulos de caupi submetidos a altas temperaturas. (continuação)

| Clone | Similaridade de sequência utilizando o programa BLAST | Valor E |
|--------|--|---------|
| 24.1A | Celulase A (<i>Polyplastron multivesiculatum</i>) | 0.016 |
| 24.2A' | Proteína da família Maf (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | 5e-21 |
| 15.2B | Proteína de Choque térmico 18.5 (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 5e-53 |
| 11.1B | Proteína de Choque térmico 17.9 kDa classe II (<i>G. max</i>) | 5e-22 |
| 24.1B | Proteína de Choque térmico 18.5 (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 6e-39 |
| 20.1A | Proteína de Choque térmico 18.5 (GmHSP 18.5 kDa classe I) | 3e-39 |
| 1.2A | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 4e-61 |
| 3.1A | Leghemoglobina I (<i>V. unguiculata</i>) | 1e-21 |
| 9.1B | Sem homologia | |
| 1.1A | Leghemoglobina II (<i>V. unguiculata</i>) | 6e-43 |
| 2.1A | ATPase envolvida no transporte H ⁺ (<i>Pisum sativum</i>) | 3e-14 |
| 15.1B | Sem sequência similar | |

Fig. 2. Auto-radiografia das membranas utilizadas para a triagem da biblioteca de cDNA. As setas indicam a região da placa utilizada para realização da triagens subsequentes.



plasmidial de alguns clones selecionados. Com exceção dos clones A8.2-641 e A8.2-642 houve um padrão de restrição diferente entre os demais clones. Os fragmentos obtidos foram transferidos para membrana de náilon com a sonda utilizada para a triagem. Apesar das três etapas de triagem utilizadas para cada sonda foi possível verificar que apenas os clones A8.2-641 e A8.2-642 mostram sinal de hibridização com a sonda utilizada para a triagem (Fig. 3B), demonstrando assim que há necessidade de uma etapa de checagem dos clones selecionados. No caso da utilização sondas obtidas utilizando-se o RNAm para a síntese de cDNA radioativo, a confirmação também se faz necessária. Neste caso, pode-se utilizar

Foto: Jean Luiz Simões de Araújo

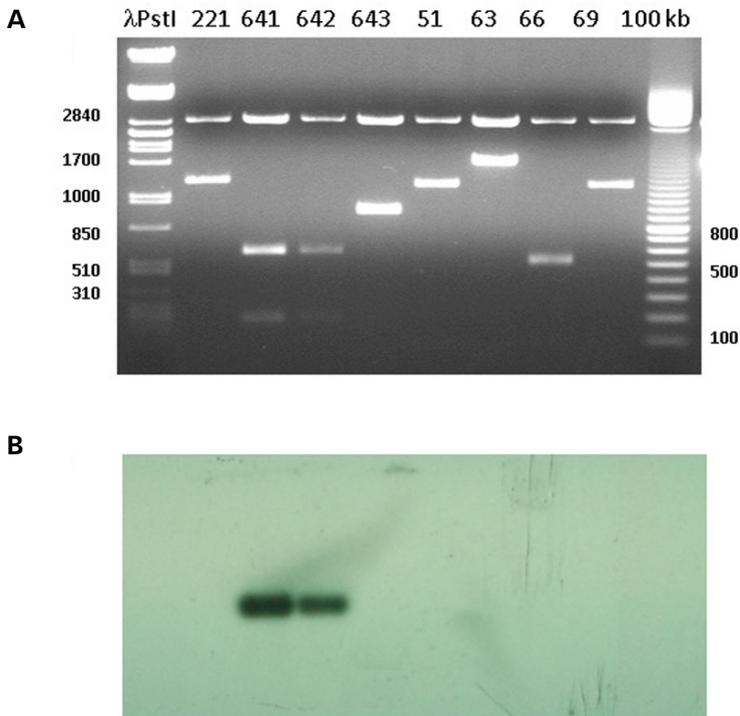


Fig. 3. A) Gel de agarose 1% mostrando a digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* do DNA plasmidial de alguns clones selecionados. **B)** O DNA mostrado na Fig. 3A foi transferido para membrana de náilon e hibridizados com o FDT A8.2 marcado com radioatividade.

experimentos de Northern blot ou PCR em tempo real para verificar o padrão de expressão dos cDNAs isolados. Quando foi utilizado como sonda o cDNA sintetizado a partir do RNAm, extraído de nódulos submetidos ao estresse térmico, foi possível obter 56 clones potencialmente com expressos em condições de altas temperaturas. A partir do plasmídeo isolado de cada clone foi realizada uma digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e após a confirmação da presença de inserto o DNA foi utilizado para reação de sequenciamento.

Análise das sequências do DNA dos clones selecionados na biblioteca

Apesar de terem sido feitas reações de sequenciamento nos dois sentidos para cada clone utilizando os iniciadores T3 (5') e T7 (3') não foi possível obter a sequência completa para a grande maioria dos clones. O tamanho do cDNA clonado geralmente foi maior que 1000 pb, o que dificultou o sequenciamento do gene completo apenas com duas reações de sequenciamento. Mesmo assim, as duas reações de sequenciamento foram utilizadas para a identificação da similaridade utilizando o programa BlastX. A Tab. 1 mostra os resultados da análise de similaridade. Cinco clones não apresentaram homologia com sequências depositadas no banco de dados; contudo, é interessante notar o grande número de clones que apresentaram homologia com proteínas de choque térmico previamente caracterizadas em soja. Essas proteínas estão relacionadas com a manutenção da integridade de outras proteínas durante a exposição a altas temperaturas (VIERLING, 1991; LEE et al., 1995 e 1996). Alguns clones apresentaram homologia com proteínas expressas preferencialmente nos nódulos, como: Leghemoglobina I e II, nodulina 22, nodulina 26, nodulina 30 e nodulina 7. Estas proteínas estão diretamente relacionadas com a atividade do nódulo; no entanto, o seu papel durante o estresse térmico precisa ser mais bem avaliado. As alterações metabólicas em função da exposição a altas temperaturas provoca alterações na transcrição e tradução gênica, acarretando mudanças fisiológicas e de desenvolvimento, diversas genes relacionadas com essas funções celulares foram isolados incluindo: proteína ribossomal L13, ciclina B, fatores de transcrição da família MAF, celulase A, Fator de ribosilação de ADP. Além disso, também foram clones com homologia a fatores de ribosilação de ADP (ARFs). Em plantas o ARF1 tem

um papel essencial no transporte da H^+ + ATPase do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, seu local de atuação (LEE et al., 2002). ARF1 também foi isolado a partir da triagem de uma biblioteca de folhas de *Nicotiana benthamiana* tratado com herbicida paraquat, neste caso, parece está envolvido com a resistência contra bactérias e provoca morte celular quando superexpresso em *N. benthamiana* (COEMANS et al., 2008).

Para um maior detalhamento do padrão de expressão dos genes isolados seis clones foram selecionados para serem empregados em experimento de Northern blot utilizando os fragmentos de cDNA como sonda (Fig. 4). Os seguintes clones foram utilizados: clone 1.3A (Nodulina 30), clone 24.2A (Proteína MAF), clone 24.3A (Nodulina 22), clone 4.1B (Proteína de choque térmico HSP18), clone 3.1A (Proteína de choque térmico HSP18,5), clone 14.1A (Proteína sem função conhecida). Apesar de ter havido hibridização para todos os clones, confirmando que todos são expressos em nódulos de caupi submetido ao estresse térmico, o padrão de indução observado foi bastante diferente, sugerindo que esses genes estão sujeitos a uma regulação diferenciada. A Nodulina 22 e Nodulina 30 são expressas tanto na condição controle (28°C), quanto em condições de estresse térmico (40°C); no entanto, o padrão observado, sugere um pequeno aumento dos níveis de transcritos em condições de estresse térmico. Um padrão bastante similar foi observado para Proteína de função não conhecida (o clone 14.1A). Para a proteína de choque térmico de baixo peso molecular (HSP18,5 kDa) também foi observado expressão na condição controle. No entanto, a indução da HSP 18,5 kDa sob estresse é maior, quando comparado com as nodulinas. Para a HSP18 kDa não foi observado expressão nas condição controle (28°C) e alta indução em condições de estresse térmico, principalmente após duas horas a 40°C. No caso da proteína MAF houve uma diminuição do nível de expressão em condições de estresse. Os resultados de *Northern blot* confirmaram que os seis clones avaliados são diferencialmente expressos. Além disso, devem atuar de modo diferenciado durante o estresse térmico, uma vez que o padrão de expressão foi bem distinto para os diferentes genes. No entanto, há necessidade de uma caracterização funcional mais detalhada para estabelecer qual a importância dessas proteínas na resposta ao estresse térmico nos nódulos.

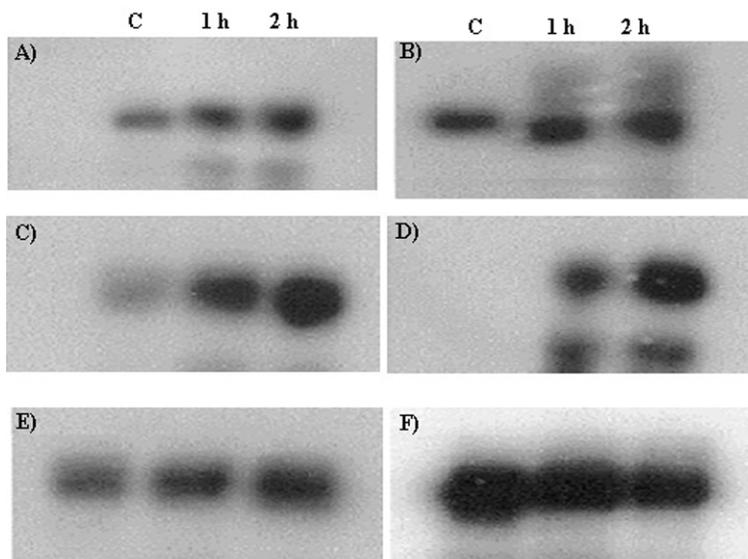


Fig. 4. Padrão de expressão de genes isolados de nódulos de caupi submetidos a estresse térmico C=28°C; 60 min a 40°C ou 120 min.; 40°C: **A)** Nodulina 22; **B)** Nodulina 30; **C)** Proteína de choque térmico (HSP18,5 kDa); **D)** Proteína de choque térmico (HSP18 kDa); **E)** Proteína de função ainda não conhecida; **F)** Proteína MAF.

Conclusão

1. A construção e triagem de uma biblioteca de cDNA em fago mostrou-se uma alternativa importante para o isolamento do cDNA de genes induzidos por altas temperaturas em nódulos.
2. A utilização como sonda, tanto de fragmento de genes de interesse amplificado por PCR, como o cDNA sintetizado a partir de RNA mensageiro, possibilitou o isolamento de diversos genes induzidos por altas temperaturas.

Referências Bibliográficas

BACHEM, C. W. B.; OOMEN, R. J. F. J.; VISSER, R. G. F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, n. 2, p.157-173, 1998.

BACHEM, C. W. B.; VANDERHOEVEN, R. S.; DEBRUIJN, S. M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant Journal**, v. 9, n. 5, p. 745-753, 1996.

BARRIOS, S.; RAGGIO, N.; RAGGIO, M. Effect of temperature on infection of isolated bean roots by rhizobia. **Plant Physiology**, v. 38, n. 2, p. 171-174, 1963.

COEMANS, B.; TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; ITO, A.; KANZAKI, H.; MATSUMURA, H.; SAITOH, H.; TSUDA, S.; KAMOUN, S.; SAGI, L.; SWENNEN, R.; TERAUCHI, R. High-throughput in planta expression screening identifies an ADP-ribosylation factor (ARF1) involved in non-host resistance and R gene-mediated resistance. **Molecular Plant Pathology**, v.9, p. 25-36, 2008

DEAN, R. M.; RIVERS, R. L.; ZEIDEL, M. L.; ROBERTS, D. M. Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 347-353, 1999.

EHLERS, J. D., HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**, v. 53, p.187-204, 1997.

GRAHAM, P. H.; HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus vulgaris* L. In: VINCENT, J. M.; WHITNEY, A. S. (Ed.). **Exploiting the symbiosis in the tropical agriculture**. Base, 1977. p. 313-333.

HERNANDEZ-ARMENTA, R.; WIEN, H. C.; EAGLESHAM, A. R. J. Maximum temperature for nitrogen-fixation in common bean. **Crop Science**, v. 29, n. 5, p. 1260-1265, 1989.

IUCHI, S.; YAMAGUCHISHINOZAKI, K.; URAO, T. Characterization of two cDNAs for novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea. **Journal of Plant Research**, v. 109, n. 1096, p. 415-424, 1996.

LEE, G. J.; BASHA, E.; SUZUKI, T.; WATERS, E. R.; KRAWITZ, D.; AZPIROZ, R.; WEHMEYER, N.; VIERLING, E. Structure and molecular chaperone activity of small heat shock proteins. **Plant Physiology**, v. 111, n. 2, p. 210-221. 1996.

LEE, G. J.; POKALA, N.; VIERLING, E. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat-shock proteins from pea. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10432-10438, 1995.

LEE, M. H.; MIN, M. K.; LEE, Y. J.; JIN, J. B.; SHIN, D. H.; KIM, D. H.; LEE, K. H.; HWANG, I. ADP-Ribosylation Factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intercellular trafficking and maintenance of endoplasmatic reticulum morphology in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1507-1520, 2002.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger-rna by means of the polymerase chain-reaction. **Science**, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988.

MERCANTE, F. M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro.** Dissertação. (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 1993.

MOROTO, C.; VIDOR, C.; MENDES, N. G. Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p. 43-150, 1990.

NORRIS, D. O.; T`MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Thioliium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, p. 214-235, 1964.

PAREEK, A.; SINGLA, S. L.; GROVER, A. Immunological evidence for accumulation of 2 high-molecular-weight (104 and 90 KDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high-temperature stress in diverse plant genera. **Plant Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 293-301, 1995.

PIHA, M. I.; MUNNS, D. N. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil-temperature. **Plant and Soil**, v. 98, n. 2, p. 183-194, 1987.

PRANDL, R.; HINDERHOFER, K.; EGGERS-SCHUMACHER, G.; SCHOFFL, F. HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. **Molecular and General Genetics**, v. 258, n. 3, p. 269-278, 1998.

RIVERS, R. L.; DEAN, R. M.; CHANDY, G.; HALL, J. E.; ROBERTS, D. M.; ZEIDEL, M. L. Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 26, p. 16256-16261, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Press, NY, 1989.

VIERKING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WATERS, E. R. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. **Genetics**, v. 141, n. 2, p. 785-795, 1995.

WATERS, E. R., LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 296, p. 325-338, 1996.

Embrapa

Agrobiologia

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**