

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

KAMILA KATIELI KOVALI

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA DE FEIJOEIRO
EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2016

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

KAMILA KATIELI KOVALI

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA DE FEIJOEIRO
EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2016

KAMILA KATIELI KOVALI

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA DE FEIJOEIRO
EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto

PATO BRANCO

2016

Kovali, Kamila Katieli

Análise dos padrões de metilação do DNA de feijoeiro em resposta ao déficit hídrico/ Kamila Katieli Kovali.

Pato Branco. UTFPR, 2015

72 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. Pato Branco, 2015.

Bibliografia: f. 43 – 49

1. Agronomia. 2. Epigenética. 3. Enzimas Sensíveis à Metilação. 4. Capacidade de Campo I. Finatto, Taciane, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. IV. Análise dos padrões de metilação do DNA de feijoeiro em resposta ao déficit hídrico.

CDD: 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias
Curso de Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC

ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA DE FEIJOEIRO
EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO

por

KAMILA KATIELI KOVALI

Monografia apresentada às 13 horas 30 min. do dia 25 de novembro de 2016 como requisito parcial para obtenção do título de ENGENHEIRA AGRÔNOMA, Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique de Oliveira
UTFPR

Msc Katiane Fedrigo
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto
UTFPR
Orientadora

A "Ata de Defesa" e o decorrente "Termo de Aprovação" encontram-se assinados e devidamente depositados na Coordenação do Curso de Agronomia da UTFPR Câmpus Pato Branco-PR, conforme Norma aprovada pelo Colegiado de Curso.

Dedico este, a Deus por ter me abençoado toda a vida, familiares por toda força e amparo, amigos por contribuíram para meu crescimento profissional e que fizeram parte desta longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por estar ao meu lado em todos os momentos, em especial nesta caminhada.

Aos meus pais, Paulo e Luiza Kovali, por todo o incentivo e apoio em todos os momentos da jornada de minha existência

Aos meus familiares, por toda compreensão e amor.

A minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Taciane Finatto, por todo conhecimento transmitido, por todas as horas de orientação e pela amizade. Aos demais professores que fizeram parte da construção de meu conhecimento.

Aos colegas de laboratório e amigos, que estiveram presentes em alegrias e tristezas decorrentes durante o curso.

O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre.

(Waldemar Valle Martins)

RESUMO

KOVALI, Kamila K. Análise dos Padrões de Metilação do DNA de Feijoeiro em Resposta ao Déficit Hídrico. 68 f. TCC (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

O déficit hídrico é um estresse abiótico que ocasiona grandes perdas na produtividade. Em resposta aos estresses são desencadeadas mudanças comportamentais, morfológicas, anatômicas, fisiológicas e bioquímicas, as quais são dependentes de processos moleculares de sinalização que incluem os fatores de transcrição. Dentre os processos moleculares pode-se destacar as alterações epigenéticas, responsáveis por alterações herdáveis na expressão gênica sem alterações na sequência gênica. A metilação do DNA é uma alteração epigenética, sendo que a identificação das citosinas metiladas no DNA pode ser realizada pelo uso de enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM) associada ao uso da PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase). O objetivo do estudo foi avaliar as modificações no padrão de metilação do DNA do feijão em resposta ao déficit hídrico. O delineamento experimental foi blocos ao acaso com arranjo bifatorial com três repetições, sendo quatro cultivares (IPR Curió, ANFC 9, Pérola e IAC Imperador) e quatro níveis de déficit hídrico (100% - controle, 75, 50 e 25% da capacidade de campo). A irrigação foi suprimida quando as plantas atingiram o estágio V2. O DNA foi extraído das folhas, tratado com a ERSM *HpyCH4IV*, amplificado por PCR e visualizado por eletroforese em gel de agarose. Foram testados sete pares de *primers* que flanqueiam o sítio de restrição da enzima localizados em sequências gênicas e promotoras. Alterações nos padrões de metilação foram observadas nos promotores dos genes estudados. Em 50% e 75% da capacidade de campo não foram observadas diferenças no padrão de metilação apresentado em relação ao controle em todos os genótipos. Quando a umidade do solo atingiu 25% da capacidade de campo, o genótipo IPR Curió desmetilou o DNA na região promotora do loco *Phvul.001G187100* que corresponde ao fator de transcrição *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (AP2/ERF), enquanto IAC Imperador manteve a metilação que também foi observada na condição controle. Nos demais genótipos não foi evidenciada metilação em nenhuma condição para este promotor. No promotor do loco *Phvul.005G126300* que também pertence à família AP2/ERF, a desmetilação foi observada na cultivar IAC Imperador em 25% da capacidade de campo, os demais genótipos permaneceram metilados em todas as condições analisadas. Estas modificações encontradas podem indicar possíveis mudanças na expressão gênica a fim de aumentar a plasticidade do genótipo frente ao estresse.

Palavras-chave: Epigenética. Enzimas de restrição sensíveis a metilação. Capacidade de campo.

ABSTRACT

KOVALI, Kamila K. DNA Methylation Patterns of Common Bean in Response to Drought. 74 f. TCC (Course of Agronomy) - Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2016.

Drought is an abiotic stress which causes great losses in productivity. In response to stress are triggered behavioral, morphological, anatomical, physiological and biochemical changes which are dependent on molecular signaling processes including transcription factors. Among the molecular processes can be highlighted epigenetic changes, responsible for heritable changes in gene expression without alterations in gene sequence. DNA methylation is an epigenetic change, and the identification of methylated cytosines in DNA can be accomplished by using restriction enzymes sensitive to methylation (RESM) associated with the use of PCR (Reaction Polimerase DNA chain). The objective of this study was to analyze the changes in the common bean DNA methylation pattern in response to water deficit. The experimental design was randomized blocks with factorial arrangement and three replications, four cultivars (IPR Curió, ANFC 9, Pérola and IAC Imperador and four drought levels (100 - control, 75, 50 and 25% of capacity field). Irrigation was suppressed when the plants reached the V2 stage. DNA was extracted from leaves treated with ERSM *HpyCH4IV*, amplified by PCR and visualized by agarose gel electrophoresis. We tested seven pairs of primers flanking the restriction site located in the gene and promoter DNA sequences. Changes in methylation patterns were observed in promoters of genes studied. 50% and 75% of field capacity were no differences in the methylation pattern presented in the control in all genotypes. When soil moisture reached 25% of field capacity, IPR Curió genotype demethylated DNA in the promoter region from *Phvul.001G187100 locus* that corresponds to the transcription factor APETALA2 / ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2 / ERF), while in the same sequence, IAC Imperador kept the methylation which was also observed in the control condition, in the other genotypes was not observed demethylation in any condition for this promoter. In the promoter of the *Phvul.005G126300 locus* which also belongs to the AP2 / ERF family, demethylation was observed in IAC Imperador in 25% of field capacity, the other genotypes remained methylated in all analyzed conditions. These changes may indicate possible changes in gene expression in order to increase the plasticity of genotypes face to stress.

Keywords: Epigenetics. Restriction enzymes sensitive to methylation. Field Capacity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Representação esquemática da rota de sinalização da via de transdução de ABA-Dependente e ABA-Independente. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.....21
- Figura 2 – Frequência de sequências promotoras com sítios de restrição das enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2016.....26
- Figura 3 – Frequência de enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) com sítios de restrição nas sequências promotoras estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2016.....27
- Figura 4 – Frequência de sequências gênicas com sítios de restrição das enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM) estudadas. Câmpus Pato Branco-PR, 2016.....28
- Figura 5 – Frequência de enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) com sítios de restrição nas sequências gênicas estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2016.....29
- Figura 6 – Gel de Agarose 1,8% com os produtos da PCR para os *primers* testados. Onde A corresponde ao *primer* 1 (Sequência promotora do loco *Phvul.001G187100*) com tamanho de *amplicon* 342 pb, B ao *primer* 2 (Sequência gênica do loco *Phvul.001G187100*) com tamanho de *amplicon* 168 pb, C *primer* 3 (Sequência promotora do loco *Phvul.005G126300*) com tamanho de *amplicon* 517 pb, D *primer* 4 (Sequência gênica do loco *Phvul.005G126300*) com tamanho de *amplicon* 426 pb e E *primer* 5 (Sequência promotora do loco *Phvul.002G275000*) com tamanho de *amplicon* 326 pb. Foi utilizado o marcador de 100pb marca Kasvi®.....35
- Tabela 4 – Comparação de médias da massa fresca acumulada em raiz, massa fresca e seca acumulada em parte aérea e acúmulo de prolina nas folhas, das cultivares de feijão IPR Curió, IAC Imperador, Pérola e ANFC 9, em resposta ao déficit hídrico de 100 (controle), 75, 50 e 25% da capacidade de campo no vegetativo V2. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016..... 38
- Figura 7 – Médias para MSR das cultivares IPR Curió (A), IAC Imperador (B); Pérola (C), ANFC 9 (D). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. As barras indicam o erro padrão da média.. 39
- Figura 8 – Médias para acúmulo de Prolina das cultivares IPR Curió (A), IAC Imperador (B); Pérola (C), ANFC 9 (D). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. As barras indicam o erro padrão da média..... 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultado do alinhamento local (tBLASTn) das sequências de aminoácidos de genes testados para a tolerância à seca em grandes culturas contra o genoma do feijão no banco de dados *Phytozome*. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.....24
- Tabela 2 – Denominação dos *primers*, tipo de sequência, seu loco, função, sequência de aminoácidos e tamanho do fragmento amplificado. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.....32
- Tabela 3 – Resumo da análise de variância da massa fresca e seca acumulada em raízes e parte aérea e acúmulo de prolina nas folhas, das cultivares de feijão IPR Curió, IAC Imperador, Pérola e ANFC 9, em resposta ao déficit hídrico de 100 (controle), 75, 50 e 25% da capacidade de campo no vegetativo V2. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.....36

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

CIAT	International Center for Tropical Agriculture
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
ONU	Organização das Nações Unidas
PR	Unidade da Federação – Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
ABRE	ABA-responsive element
AP2	APETALA2 domain
b-ZIP	Basic leucine Zipper Domain
CC	Capacidade de Campo
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DRE	Drought-responsive element
DREB	dehydration responsive element-binding protein
ERF	Ethylene-responsive factor
ERSM	Enzimas de Restrição Sensíveis a Metilação
FTs	Fatores de Transcrição
MFPA	Massa Fresca de Parte Aérea
MFR	Massa Fresca de Raiz
MSPA	Massa Seca de Parte Aérea
MSR	Massa Seca de Raiz
MYB	Myeloblastosis oncogene
MYC	Myelocystomatosis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimerase Chain Reaction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 FEIJÃO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	18
3.2 RESPOSTA DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO.....	19
3.2.1 Respostas fisiológicas, morfo-anatômicas, bioquímicas envolvidas na tolerância à seca.....	19
3.2.2 Respostas Moleculares Envolvidas na Tolerância à Seca e Genes Envolvidos na Resposta ao Déficit Hídrico.....	20
3.3 epigenética.....	22
3.3.1 Identificação da Metilação do DNA por Enzimas de Restrição Sensíveis a Metilação (ERSM).....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	25
4.1.1 Identificação dos Sítios de Restrição das Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação (ERSM) nas sequências de DNA.....	25
4.1.2 Desenho de <i>Primers</i>	26
4.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	26
4.3 APLICAÇÃO DO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO.....	26
4.4 ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO COM ERSM E PCR.....	27
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MATÉRIA FRESCA E SECA.....	28
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROLINA.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	29
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.....	25
5.3 DESENHO DE <i>PRIMERS</i>	30
5.5 ANÁLISE DE MATÉRIA SECA E ACÚMULO DE PROLINA.....	36
6 CONCLUSÕES	41
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	51
ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

A adaptação dos vegetais, em especial aqueles que possuem valores nutricionais e são utilizados na alimentação humana, frente as mudanças climáticas vêm sendo estudada recentemente. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2011), para suprir as demandas dos próximos anos, a produção de alimentos no mundo dever aumentar em cerca de 70%, e este é o grande desafio. A adaptação de plantas a ambientes de estresse é um desafio da agricultura moderna, e a deficiência hídrica se destaca pela amplitude de ocorrência e o decréscimo na produtividade (GUIMARÃES et al., 2011).

Dentro do gênero *Phaseolus*, o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada (SILVA et al., 2006), com cerca de 26 milhões de hectares plantados (EMAM et al., 2010). O Brasil, além de ser um dos maiores produtores desta leguminosa, também é um dos maiores consumidores. O estado do Paraná é o maior produtor nacional representando cerca de 30% da produção do Brasil e mais da metade da produção da região sul (ANDRADE et al., 2004; CONAB, 2016). Além da importância econômica, a leguminosa é componente das refeições dos brasileiros, pois é uma das principais fontes de proteína (LIMA; CORREA, 2015).

Devido à grande importância de leguminosas secas como o feijão na alimentação humana do mundo inteiro, a 68ª Assembleia Geral da ONU (Organização das Nações Unidas) declarou “2016 o Ano Internacional das Leguminosas” (*International Year of Pulses*) com o tema: “Sementes Nutritivas para um Futuro Sustentável”. Segundo a FAO, as leguminosas secas (feijão, ervilha, grão-de-bico, lentilhas) representam uma fonte alternativa de proteínas mais barata do que as encontradas nas carnes. Elas também apresentam o dobro das proteínas do trigo e o triplo do arroz, são ricas em micronutrientes, aminoácidos e vitamina B, substâncias que as tornam componentes essenciais de uma dieta saudável (FAO, 2015).

Na América Latina aproximadamente 93% da área de cultivo de feijão, não possui necessidade hídrica satisfatória durante o ciclo (SINGH, 1995), e a redução de produtividade aumenta a medida que o déficit hídrico aumenta (EMAM et

al., 2010). Durante a exposição a condição de estresse, as plantas se utilizam de estratégias com o objetivo de minimizar os seus efeitos, dentre elas estão incluídas alterações de vias metabólicas e modificações na expressão gênica, as quais podem ser herdadas (GRATIVOL et al., 2011).

A informação gênica contida na sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico) e a expressão em resposta a um sinal ambiental são cruciais para a adaptação de um genótipo. O desenvolvimento e o estímulo ambiental podem induzir a modificações epigenéticas, ou seja, para um mesmo genoma de uma célula da planta podem ocorrer múltiplos epigenomas devido a resposta ao estresse (CHINNUSAMY; ZHU, 2009). Estes mecanismos regulam variadas funções genéticas que incluem transcrição, replicação do DNA, entre outros (SAHU et al., 2013). A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos, pois desempenha papel fundamental na manutenção da estabilidade do genoma e a regulação da expressão do gene (LE et al., 2014). As plantas apresentam níveis elevados de citosinas metiladas no DNA, variando de 6 a 25% do total de citosinas, dependendo da espécie (SAHU et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar os padrões de metilação na sequência de DNA de promotores e genes que possuem associação com resposta de tolerância ao estresse por déficit hídrico bem como as respostas fisiológicas do feijoeiro a esta condição.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar massa fresca, massa seca de raiz e parte aérea e acúmulo de prolina nas folhas em exposição a diferentes intensidades de estresse (100%, 75%, 50% e 25% da capacidade de campo) nas cultivares de feijão ANFC 9, Pérola, IAC Imperador e IPR Curió em estágio vegetativo V2.

Verificar o padrão de metilação em sequências gênicas e promotoras relacionadas com a tolerância a seca nas cultivares de feijão expostas ao déficit hídrico (100%, 75%, 50% e 25% da capacidade de campo).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Segundo o *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT, 2016) um prato de feijão faz parte da dieta diária de 400 milhões de pessoas na região dos trópicos, pois o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento altamente nutritivo. Mais de 200 milhões de pessoas na África subsaariana dependem do feijão como parte primária de sua alimentação, e em partes da América e da África ainda é o legume mais consumido, compondo cerca de 15% das calorias e 36% da quantidade de proteína diária (SCHMUTZ et al., 2014).

No ano de 2014 o Brasil produziu aproximadamente 3,29 milhões de toneladas de feijão sendo o terceiro país com maior produção, neste mesmo ano a maior produção registrada foi de 4,11 milhões de toneladas na Índia (FAO, 2016). No estado do Paraná, o feijão de primeira safra no mesmo ano de 2014 foi aproximadamente de 192,7 mil hectares e uma estimativa de aumento de 6,5% para safra de 2015/2016. O Paraná é o estado com maior produção, na safra 2015/2016 serão produzidas aproximadamente 328,9 mil toneladas, o que corresponde cerca de 29% da produção nacional e 67% da produção da região sul (PR, SC e RS) do país (CONAB, 2016).

Atualmente, o cultivo do feijão ainda é altamente afetado por fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores abióticos, a tolerância à seca é uma característica a ser melhorada para adaptar e permitir o cultivo da leguminosa devido aos impactos das alterações climáticas. A deficiência hídrica é sentida quando a taxa de evapotranspiração é maior que a taxa de absorção de água pelas raízes, como o feijoeiro possui um sistema radicular superficial pequenas estiagens são sentidas rapidamente pela cultura. O feijoeiro é uma espécie pouco tolerante a falta de água, no período da semeadura até a emissão do quarto trifólio a deficiência hídrica é responsável pela redução no número de plantas que resulta em menor produção de grãos, nos primeiros 20 dias a redução na produção pode ser 16 a 42% em relação a produtividade obtida em condições de campo de 0,01 MPa (PEREIRA et al., 2014). Quando ocorre períodos de estiagens na fase reprodutiva a produção é

drasticamente reduzida devido principalmente ao abortamento de flores e vagens (WHITE, 1993).

3.2 RESPOSTA DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO

3.2.1 Respostas fisiológicas, morfo-anatômicas, bioquímicas envolvidas na tolerância à seca

As plantas, quando expostas a condições ambientais estressantes, desencadeiam alterações em processos de âmbito comportamental, morfológico, anatômico, fisiológico e bioquímico, os quais dependem de processos moleculares. Sob estresse ocorrem sinalizações que podem gerar o silenciamento ou superexpressão de determinado gene (JALEEL et al., 2009; MIZOI et al., 2012).

Durante o período evolutivo, as plantas desenvolveram estratégias naturais para tolerar ou evitar condições de déficit hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2004). As alterações desenvolvidas envolvem fechamento estomático, aumento de respiração, entre outros (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006). As estratégias utilizadas em condições de déficit hídrico pelas plantas envolvem quatro mecanismos, que são a evitação, tolerância, escape e recuperação à seca (FANG; XIONG, 2015). A evitação à seca envolve estratégias de manter níveis altos de água nos tecidos vegetais durante o estresse, podendo ser por maior eficiência na absorção da água pelas raízes, ou redução da evapotranspiração das partes aéreas, já a tolerância é representada pela manutenção do turgor e continuidade do metabolismo apesar no baixo potencial hídrico, sendo alcançada por meio de síntese de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997). O escape à seca é determinado pela capacidade natural ou induzida de ajustar o ciclo de crescimento da planta com períodos de déficit hídrico, como o uso de cultivares precoces garantindo o florescimento em períodos com condições suficientes de água, a recuperação das plantas à seca compreende a capacidade da planta retomar o crescimento e sua produção após a exposição a uma seca severa, a qual causa perda da turgescência e desidratação das folhas (FANG; XIONG, 2015).

A tolerância envolve respostas que podem ser a curto prazo com produção de substâncias 'protetoras' contra o estresse ou a longo prazo (GRANT-DOWNTOW; DICKINSON, 2006) como o aprofundamento das raízes, por exemplo. Sob influência de estresses, a síntese de proteínas é inibida e a degradação das proteínas é acelerada levando um acúmulo de aminoácidos e aminas livres (FUMIS; PEDRAS, 2002). O acúmulo de prolina frequentemente vem sendo relacionado com a resposta ao déficit hídrico sendo armazenada nos tecidos vegetais como maneira de promover tolerância da planta à seca (JOHARI-PIREIVATLOU, 2009). A síntese de prolina possui várias funções durante o estresse, dentre elas: ajuste e proteção osmótica – acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos que contribui para a continuidade dos processos fisiológicos mesmo que em níveis de atividade menores (COELHO, 2012), elimina radicais livres e antioxidante, protege macromoléculas da desnaturação, é reguladora da acidez citosólica (VENDRUSCULO et al., 2007).

3.2.2 Respostas Moleculares Envolvidas na Tolerância à Seca e Genes Envolvidos na Resposta ao Déficit Hídrico

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal importante que participa de muitos processos fisiológicos nas plantas, entre os quais a ativação de genes responsivos ao estresse. Seca, frio, dessecação, calor, entre outros estresses ambientais aumentam os níveis de ABA na planta, sendo assim, um importante sinal fisiológico que induz respostas a seca e a salinidade (SAKUMA et al., 2001; LATA; PRASAD, 2011). O ABA além de controlar respostas para adaptação ao estresse, como ativação de genes responsáveis pela regulação osmótica, também está relacionado com modificações na expressão gênica, aumentando a expressão de vários genes que são responsivos ao estresse. Embora muitos genes sejam induzidos por ABA exógeno, muitos outros não respondem, o que sugere a existência de duas cascatas de transdução, ABA-dependente e ABA-independente, conforme descrito na figura 1 (LATA; PRASAD, 2011). ABA-dependente tem sido descrita como mediadora de adaptação à seca por ativação de proteínas bZIP (*Basic leucine Zipper domain*) que se ligam aos elementos regulatórios responsivos

a ABA (ABRE) em genes alvos, induzindo a transcrição dos mesmos. Além destes, outra via dependente de ABA se refere a biossíntese do MYC (*Myelocystomatosis*) e fatores de transcrição (FTs) MYB (*myeloblastosis oncogene*) que conjuntamente regulam a expressão de genes alvos. Já para ABA-independente os membros da família de FTs AP2/ERF (*APETALA 2/ethylene-responsive element binding fator*) levam a respostas rápidas à seca e ao frio, os quais ligam elementos responsivos à seca (DRE – *Drought-responsive element*) em promotores alvo (KIZIS et al., 2001), conforme é observado na figura 1. Os FTs ativados interagem com elementos *cis* presentes nas regiões promotoras de vários genes relacionados com o estresse, e assim aumentam a expressão de muitos genes relacionados com a tolerância a estresses abióticos (AGARWAL et al., 2006). Proteínas da subfamília DREB (*dehydration responsive element-binding protein*) interagem com elementos *cis* DRE/CRT, que geralmente estão presentes nas regiões promotoras de genes envolvidos na resposta ao frio, seca e salinidade (SANTOS et al., 2011).

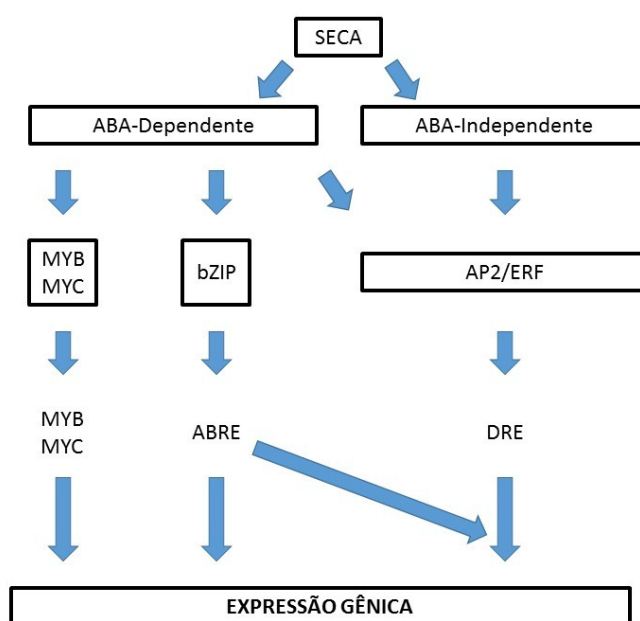


Figura 1 – Representação esquemática da rota de sinalização da via de transdução de ABA-Dependente e ABA-Independente. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.

Os FTs da família AP2/ERF, bem como das famílias bZIP, MYB, NAC (NAM, ATAF1, 2 e CUC2), WRKY (aminoácidos W, R, K, Y) e Zn-finger, foram descritos como relacionados com a tolerância a estresses abióticos, sendo assim a metilação do DNA e a expressão destes FTs estão correlacionados (SANTOS et al.,

2011). A família de FTs AP2/ERF é um amplo grupo que inclui quatro subfamílias maiores: AP2, RAV, ERF e DREB, os quais têm sido amplamente estudados e tem sua expressão induzida por estresses bióticos e abióticos (MIZOI et al., 2012). Proteínas AP2/ERF são exclusivas das plantas e compartilham de uma região altamente conservada de 60 a 70 aminoácidos, e esta região é chamada de domínio AP2 (KIZIS, et al., 2001). Proteínas DREB e ERF contém um único domínio AP2 e caracterizados como reguladores na resposta a estresse abiótico e biótico (SANTOS et al., 2011).

Com base em estudos em *Arabidopsis* (SANTOS et al., 2011), a subfamília DREB pode ser dicotomizada como DREB1 e DREB2, que estão envolvidos em duas rotas transcricionais separadas, para baixas temperaturas e desidratação respectivamente (AGARWAL et al., 2006; LATA; PRASAD, 2011).

Além destas vias de aumento da expressão gênica, há também a regulação gênica por mecanismos epigenéticos, que recentemente tem sido relacionados com a adaptação a estresses e mostram-se eficientes no processo evolutivo, pois estes mecanismos regulam funções genéticas como a transcrição, replicação, reparo do DNA, transposição de genes (*transposons*), e diferenciação celular (SAHU et al., 2013). Autores como, Zhang (2008) afirmam que a regulação gênica pela metilação depende do local em que ela se encontra, citosinas metiladas em regiões promotoras de sequências gênicas indicam uma supressão na expressão do gene, sendo assim, a desmetilação indica o aumento da expressão do gene (TAN, 2010).

3.3 EPIGENÉTICA

A epigenética define-se como mudanças herdáveis na expressão gênica, porém sem que ocorra mudanças na sequência codificadora de um gene ou promotor localizado à montante da região codificadora. Diferentemente dos demais mecanismos genéticos, como as mutações, na epigenética, as mudanças ocorridas são reversíveis (RAPP; WENDEL, 2005). Porém a epigenética pode ser responsável por mudanças fenotípicas as quais são transmitidas aos descendentes devido à sensibilidade as mudanças ambientais que os padrões epigenéticos apresentam. A

memória epigenética que é acumulada pelas plantas durante a fase vegetativa sob a influência ambiental é passada a próxima geração de células germinativas que se estabelece na sequência do desenvolvimento da planta (SAHU et al., 2013).

Vários são os mecanismos epigenéticos que tem sido relatados, dentre eles a metilação do DNA, as modificações na cromatina (metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação) e os pequenos RNAs (BRUCE et al., 2007; GRATIVOL et al., 2011). Modificações na cromatina e a geração de pequenos RNAs estão envolvidos no controle da expressão gênica (transcricional e pós-transcricional) sendo essas modificações críticas para a resposta a estresses (SAHU et al., 2013).

Entre as mudanças de ordem epigenética, a mais comum é a metilação do DNA, na qual é transferido um grupamento metil da S-adenosilmetionina para o carbono 5 da citosina convertendo-a para 5 metil citosina (5mC), sendo influenciado por fluxos hormonais (SAHU et al., 2013). A metilação de citosinas em plantas pode ocorrer de três formas CG, CHG e CHH, onde H pode ser A (adenina), C (citosina) ou T (timina), as formas CG e CHG são simétricas e podem ser simplesmente copiadas após a replicação do DNA, já a forma não simétrica – CHH – a metilação da citosina deve ser novamente estabelecida a cada novo ciclo de replicação do DNA (SAHU et al., 2013; MIROUZE; PASZKOWSKI, 2011). Três grupos de enzimas estão envolvidas na metilação da citosina: *Methyltransferase 1 (MET1)*, *Chromomethylase3 (CMT3)* e *Domains Rearranged Methylase (DRM)*. Já o estado da metilação é dependente de enzimas de desmetilação e as metiltransferases (SAHU et al., 2013).

3.3.1 Identificação da Metilação do DNA por Enzimas de Restrição Sensíveis a Metilação (ERSM)

Algumas técnicas foram desenvolvidas com objetivo de identificar a ocorrência da metilação do DNA, dentre elas, uso de enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM) combinado com PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (HERMAN et al., 1996), ChIP-seq que consiste na imunoprecipitação da cromatina (ChIP) de fatores de transcrição seguido de sequenciamento (seq) (PARK, 2009) e tratamento do DNA com bisulfite seguido de sequenciamento. A técnica de tratamento com

bisulfite consiste na modificação química das citosinas em uracilas de modo que as citosinas metiladas permanecem imutadas e este DNA pode ser amplificado e sequenciado (HERMAN et al., 1996).

O método de identificação com uso de ERSM combina ainda o uso de PCR, após a digestão do DNA pela enzima, o DNA pode ser amplificado por PCR utilizando *primers* que flanqueiam o sítio de restrição da enzima. Se a citosina não estiver metilada, o DNA é clivado normalmente e não é amplificado pelos *primers*, e se houver a presença de metilação o DNA não é clivado permanecendo intacto sendo possível amplificar na PCR (ROACH; HASHIMOTO, 2007).

Desta forma, o uso de ERSM seguido de PCR é uma técnica de baixo custo, quando comparada com as análises em larga escala, que incluem sequenciamento, para identificar a metilação em genes e promotores específicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES *IN SILICO*

Inicialmente foram realizadas buscas por genes relacionados com a tolerância ao estresse por déficit hídrico em diferentes espécies vegetais, sendo estes reportados por Hu e Xiong et al. (2014) e em seguida realizada busca pelas sequências de aminoácidos com o auxílio do banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As sequências de aminoácidos encontradas foram alinhadas localmente utilizando a ferramenta tBLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) e alinhados contra o genoma de *Phaseolus vulgaris* L. (v1.0), sendo anotadas as sequências alinhadas, a identificação (id) do gene e a identidade (%), o *E-value*, o loco do gene e a descrição de sua função. De posse das sequências homólogas, no *Phytozome* foram realizadas buscas das sequências dos promotores e dos genes. Foi considerado como sequências promotoras, a sequência de aminoácidos que ocorre 2000 pb a montante do início do respectivo gene.

4.1.1 Identificação dos Sítios de Restrição das Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação (ERSM) nas sequências de DNA

Foi utilizado o software *Restriccion Mapper* (<http://www.restrictionmapper.org/>) para encontrar os sítios de restrição das ERSMs reportadas por Roach e Hashimoto (2007) nas sequências gênicas e promotoras escolhidas. O resultado da análise contendo a denominação da enzima e a posição do sítio de restrição foram anotados.

4.1.2 Desenho de *Primers*

Os *primers* que flanqueiam a região de interesse contendo o sítio de restrição das ERSM (Enzimas de restrição sensíveis a metilação) foram desenhados no programa Primer3 Plus (UNTERGASSER et al., 2007) e sintetizados artificialmente.

4.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado em sala de crescimento vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco, com fotoperíodo de quatorze horas. Os feijões foram semeados em copos descartáveis com capacidade de 400 mL furados no fundo e preenchidos com 280 gramas de solo e areia (proporção 3:1). Foram semeadas quatro sementes por copo e após a emergência realizou-se raleio manual onde foi mantido apenas uma plântula por copo. A irrigação foi realizada manualmente mantendo o solo próximo a 100% da capacidade de campo.

4.3 APLICAÇÃO DO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

O experimento foi instalado em delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial (4x4) com quatro cultivares (IPR Curió, ANFC 9, Pérola e IAC Imperador) x duas condições (controle e déficit hídrico) para retirar o efeito do estágio fenológico no qual as plantas se encontravam x quatro níveis de déficit hídrico (100%, 75%, 50% e 25% da capacidade de campo), com três repetições compostas por dois vasos cada.

A supressão da irrigação foi efetuada quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V2 e a capacidade de campo acompanhada utilizando o método da pesagem, conforme recomendação de Pereira et al. (2012). Este método consiste em avaliar a capacidade de campo utilizando três copos com o mesmo tipo e quantidade de substrato. Primeiramente foi realizada a pesagem do substrato seco,

adicionou-se água por capilaridade até saturar o solo, quando não escoou mais água (tempo não inferior a 8 horas), foi feita a segunda pesagem. A diferença entre as pesagens indica a quantidade de água presente em 100% da capacidade de campo. As coletas das amostras vegetais e análises foram realizadas quando a capacidade de campo do solo atingiu os quatro diferentes níveis de estresse supracitados.

4.4 ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO COM ERSM E PCR

Após a supressão da irrigação quando a capacidade de campo atingiu os valores esperados, o material vegetal (folhas e raízes) foi coletado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer (-80 °C), para extração de DNA conforme protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações de Carvalho et al. (2010), Lefort e Douglas (1999), Lodhi et al. (1994), Sambrook et al. (1989). Sendo analisado a qualidade em gel de agarose 0.8% e quantificado em espectrofotômetro. As amostras que apresentaram boa integridade e quantidade foram utilizadas para a digestão com a ERSM escolhida seguindo as orientações do fabricante.

Após esse procedimento, foi realizada a amplificação (PCR) da região alvo do DNA em termociclador utilizando as seguintes condições de ciclagem: um ciclo de dois minutos a 94 °C; 35 ciclos de 94 °C por quarenta e cinco segundos, 55°C por um minuto e 72 °C por um minuto; e um ciclo de 72 °C por 10 minutos, conforme a recomendação do fabricante do kit (*Ludwig*). Os produtos resultantes da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,8% corado com *safer dye* (kasvi), observados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. As imagens obtidas foram analisadas por meio de comparação do tamanho dos fragmentos das amostras com os fragmentos do marcador de peso molecular *kasvi* 100 bp.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MATÉRIA FRESCA E SECA

A massa fresca e seca foi determinada por pesagem, sendo separada a raiz da parte aérea, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 65°C até atingirem massa constante. Sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando observada interação significativa ($P=0,05$) entre cultivar e níveis de estresse, foi realizada comparação de médias no programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROLINA

As concentrações de prolina foram determinadas segundo a metodologia descrita por Bates et al. (1973). Foram utilizadas amostras de 0,5 g de tecido congelado de folha, macerado em nitrogênio líquido e posteriormente adicionado 10 mL de ácido sulfossalicílico a 3%. Após a homogeneização foi realizada uma filtração para retirada de possíveis interferentes. Em tubos de ensaio foram colocados 2mL deste filtrado, 2 mL de ninhidrina ácida, 2 mL de ácido acético glacial e a reação foi incubada por uma hora a 100°C. Posteriormente, os tubos foram colocados em gelo com objetivo de cessar a reação, e em seguida, foram adicionados 4 mL de tolueno, agitando vigorosamente por 20 segundos. Com auxílio de uma micropipeta foram retirados 500 μ L do sobrenadante com o qual foi realizada a leitura da absorbância a 520 nm em espectrofotômetro.

A construção da curva padrão foi realizada conforme Anexo A, seguindo as etapas descritas acima, e através da qual foi obtida a equação que determinou a quantidade de prolina presente no tecido analisado, sendo calculada com base no tecido fresco.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando observada interação significativa ($P=0,05$) entre cultivar e níveis de estresse, foi realizada comparação de médias no programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Dos 68 genes reportados por Hu e Xiong (2014), 31 sequências de aminoácidos foram encontradas no banco de dados NCBI, sendo estas alinhadas localmente (*tBLASTn*) contra o genoma do feijão e o resultado está listado na tabela 1 a seguir. Em geral, o alinhamento resultou em valores de *E-value* próximos a zero, indicando que o alinhamento é significativo, não ocorrendo ao acaso. O loco *Phvul.002G238800*, homólogo ao gene do arroz *OsCIPK1*, teve *e-value* igual a zero, sendo o menor valor encontrado neste trabalho, já o maior *e-value* encontrado foi para o loco *Phvul.003G212800* que é homólogo ao gene *OsDREB1*. Ocorreu uma variação de 34,6% a 94,4% em relação a identidade, sendo a maior identidade (94,4%) encontrada para o loco *Phvul.003G195700* e a menor (34,6%) para o loco *Phvul.003G016300*.

As plantas sob condições de estresse, em nível molecular, ativam cascatas de sinalização que suprimem ou aumentam a expressão de genes-alvo. FTs são proteínas que regulam a transcrição gênica, deste modo alteram dinamicamente o transcriptoma ocasionando mudanças metabólicas e fenotípicas em resposta a determinado estímulo ambiental (MITSUDA; OHME-TAKAGI, 2009). Neste estudo foram identificados cerca de 20 genes codificadores de FTs, das famílias *AP2*, *NAM*, *Myb-like*, *WRKY* e *bZIP*. Além dos FTs, também foram identificadas proteínas quinases e proteínas com regiões ricas em leucina, as quais apresentam domínios transmembrana e atuam na percepção e desencadeamento da sinalização até o núcleo da célula. Estes resultados complementam os encontrados por Zadražnik et al. (2013) que analisaram o proteoma de duas cultivares de feijão contrastante em relação à seca e observaram que a maioria das proteínas diferencialmente expressas na cultivar tolerante foram classificadas em categorias funcionais que incluem metabolismo energético, fotossíntese, interconversão em ATP, síntese e proteólise de proteínas e proteínas relacionadas a estresses e defesa.

Tabela 1 – Resultado do alinhamento local (tBLASTn) das sequências de aminoácidos de genes testados para a tolerância à seca em grandes culturas contra o genoma do feijão no banco de dados *Phytozome*. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.

Gene*	Nº do acesso GenBank	Escore (bits)	E-value	Identidade (%)	Loco Genoma do Feijão	Descrição
<i>PaP5CS</i>	KC509603	63,5	4,1e-29	56,00	<i>Phvul.001G236900</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase family Amino acid kinase family</i>
<i>AtHARDY</i>	AT2G36450.1	159,8	5e-43	64,80	<i>Phvul.001G187100</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>OsDREB1A</i>	JN561151.1	112,1	5,6e-26	52,30	<i>Phvul.003G212800</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>OsDREB1B</i>	AF300972.1	57	2,8e-8	48,10	<i>Phvul.003G212800</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>OsDREB1B</i>	NM_118681	160,2	1,1e-42	57,50	<i>Phvul.004G122000</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>AtDREB1A</i>	AM992886.1	157,1	1,20e-41	56,00	<i>Phvul.004G122000</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>OsDREB1F</i>	AY785897.1	162,9	1,50e-43	51,10	<i>Phvul.005G126300</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>OsDREB2A</i>	JQ341059.1	125,9	3,3e-30	56,90	<i>Phvul.008G092800</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>TaDREB2</i>	DQ353852	125,9	3,3e-30	56,90	<i>Phvul.008G092800</i>	<i>AP2 domain - transcription factor</i>
<i>SIAREB1</i>	AY530758.1	307,4	5,3e-90	52,60	<i>Phvul.009G065500</i>	<i>bZIP transcription factor</i>
<i>AtLOS5</i>	NM_101519.2	104,4	2,40e-21	67,60	<i>Phvul.011G154300</i>	<i>Flavin containing amine oxidoreductase</i>
<i>HvHVA1</i>	X78205.1	44,7	4,26e-4	55,30	<i>Phvul.005G174800</i>	<i>Late embryogenesis abundant LEA-related</i>
<i>OsCDPK7</i>	AP004071.3	125,9	9,8e-30	54,10	<i>Phvul.004G143000</i>	<i>Leucine Rich Repeat</i>
<i>OsSIK1</i>	GQ423058.1	426	6,9e-127	37,90	<i>Phvul.002G187300</i>	<i>Leucine rich repeat N-terminal domain</i>
<i>TaPIMP1</i>	EF587267.1	174,1	6,80e-53	63,20	<i>Phvul.007G211800</i>	<i>Myb-like DNA-binding domain - transcription factor</i>
<i>StMYB1R-1</i>	NM_001288417	113,6	1,8e-40	94,40	<i>Phvul.003G195700</i>	<i>Myb-like DNA-binding domain - transcription factor</i>
<i>OsMYB2</i>	D88618.1	228,8	2,10e-65	74,5	<i>Phvul.009G119900</i>	<i>Myb-like DNA-binding domain - transcription factor</i>
<i>TaNAC69</i>	AY625682.1	209,1	1,50e-57	55,10	<i>Phvul.001G100200</i>	<i>No apical meristem (NAM) protein - transcription factor</i>
<i>OsNAC9</i>	AK067690	135,6	1,50e-51	81,3	<i>Phvul.002G275000</i>	<i>No apical meristem (NAM) protein - transcription factor</i>
<i>OsSNAC1</i>	DQ394702.1	135,6	1,50e-51	81,3	<i>Phvul.002G275000</i>	<i>No apical meristem (NAM) protein - transcription factor</i>
<i>AtZat10</i>	AT1G27730.1	175,3	1,1e-47	48,8	<i>Phvul.009G070800</i>	<i>Not family named</i>
<i>OsZFP252</i>	AY219847.1	103,2	6,8e-23	51,2	<i>Phvul.001G026700</i>	<i>Not family named</i>
<i>NtNPK1</i>	D26601.1	226,9	2,7e-60	42,60	<i>Phvul.006G220800</i>	<i>Protein kinase (MEKK)</i>
<i>OsCIPK12</i>	EU703798.1	624	0	64,30	<i>Phvul.002G238800</i>	<i>Protein kinase domain</i>
<i>OsMAPK5</i>	AF479884.1	276,6	5,00e-82	43,7	<i>Phvul.011G071400</i>	<i>Protein kinase domain (extracellular signal-regulated kinase)</i>
<i>OsSKIPa</i>	NM_001054719	438	8,00e-133	75,40	<i>Phvul.004G176500</i>	<i>SKIP/SNW domain - chromatin binding snw family nuclear protein</i>
<i>AtNHX1</i>	AT5G27150.1	74,7	1,9e-53	48,8	<i>Phvul.003G100600</i>	<i>Sodium/hydrogen exchanger family</i>
<i>SQS1</i>	NM_001111369.1	150,6	2,70e-37	63,90	<i>Phvul.011G040100</i>	<i>Squalene/phytoene synthase</i>
<i>OsTPS1</i>	HM050424.1	402,1	3,50e-116	34,60	<i>Phvul.003G016300</i>	<i>Trehalose-phosphatase Glycosyltransferase</i>
<i>OsWRKY30</i>	HM153428.1	295,4	2,70e-83	40,60	<i>Phvul.005G005800</i>	<i>WRKY DNA -binding domain; transcription factor activity</i>
<i>OsWRKY11</i>	AK108745.1	72	1,50e-26	72,10	<i>Phvul.001G21kj4400</i>	<i>WRKY DNA -binding domain; transcription factor activity</i>

*Genes reportados por Hu e Xiong (2014) cujas sequências de aminoácidos foram encontradas.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO

Das 53 enzimas sensíveis a metilação reportadas por Roach e Hashimoto (2007), 21 enzimas não possuem sítios de restrição em nenhum dos 27 promotores (2000 pb a montante) dos genes estudados. A enzima com maior número de promotores com sítios é a *HpyCH4IV* (24), seguida de *Acil* e *BsaAI* com 17 sítios de restrição cada, conforme pode ser observado na Figura 2 e apêndice A.

Em relação às sequências promotoras com maior número de ERSM com sítios de restrição, foram encontradas duas sequências promotoras: *Phvul.002G275000* e *Phvul.008092800* com 14 sítios de restrição às ERSM, que correspondem respectivamente ao No apical meristem (NAM) protein – transcription factor e proteína APETALA2 (AP2) Domain, ambos são fatores de transcrição (BRAY, 2004; STOCKINGER et al., 1996). O loco *Phvul.001G187100* que também codifica a proteína APETALA2 (AP2) Domain, apresentou 12 sítios de restrição e *Phvul.003G016300* que tem por função a catalisação e a transferência de açúcar de moléculas doadoras (geralmente *diphospho-sugars*) para moléculas receptoras específicas, deste modo formando ligações glicosídicas (ZHONG e YE, 2003), apresentou 11 sítios de restrição às ERSM (Apêndice B), conforme observado na Figura 3.

Para as sequências gênicas, a ERSM com maior frequência é *HpaII* com 27 sítios de restrição, seguidamente a *HpyCH4IV* apresentou 25 sítios de restrição. Foram encontradas ainda quatro ERSM que não possuem sítios de restrição nas sequências gênicas estudadas, as quais são *AscI*, *NotI*, *RsrII* e *SgrAI* (Figura 4 e Apêndice C).

A sequência gênica, correspondente ao loco *Phvul.004G176500* apresentou o maior número de ERSM, totalizando 27, o segundo loco com maior número de ERSM é *Phvul.003G212800*, com 26 enzimas com sítios de restrição. O loco *Phvul.005G126300* apresentou o menor número de ERSM com sítios de restrição, as quais foram *Acil*, *BmgBI*, *HpaII*, *Hpy99I*, *HpyCH4IV* (Figura 5 e Apêndice D).

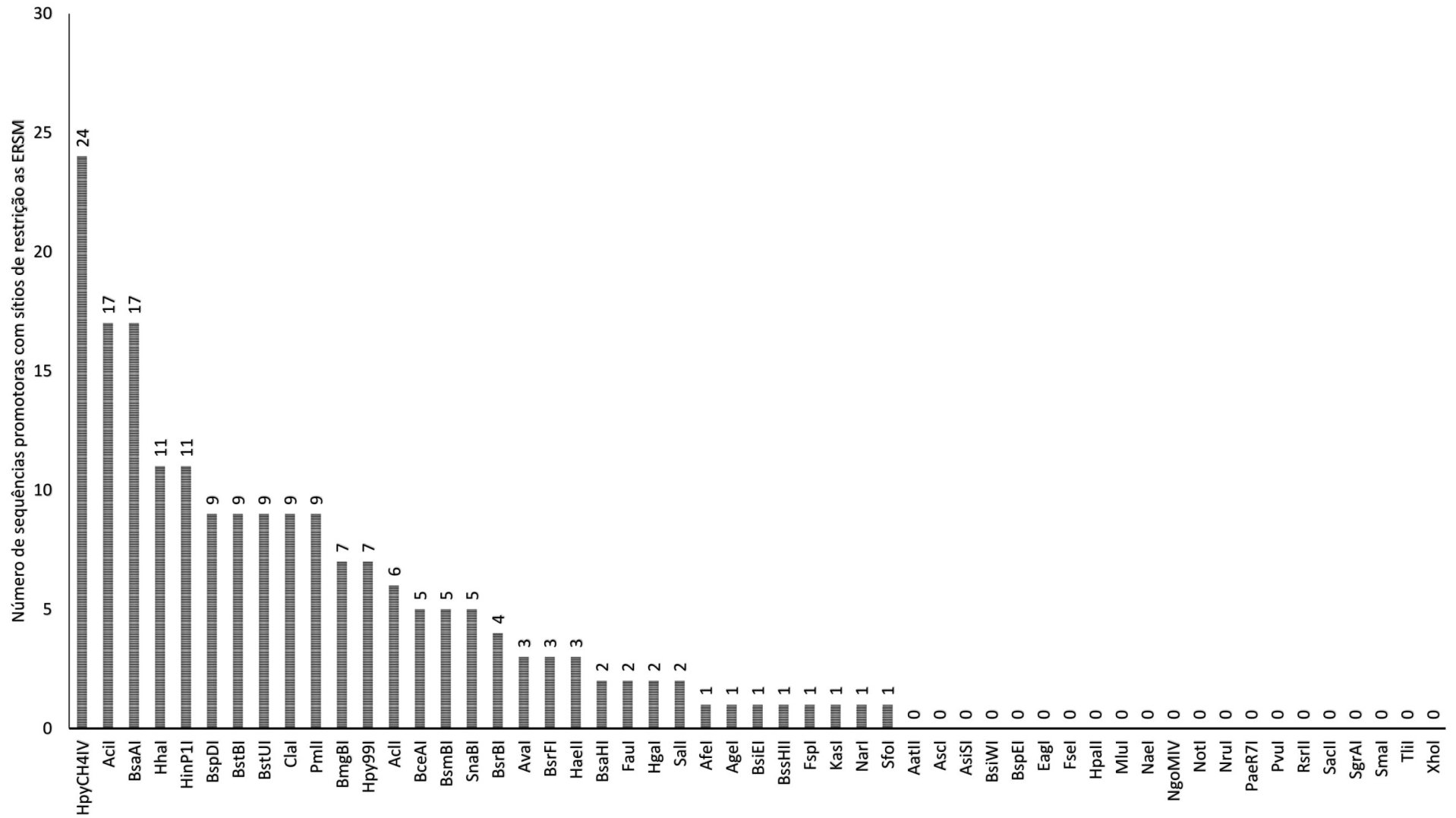


Figura 2 – Frequência de seqüências promotoras com sítios de restrição das enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2016.

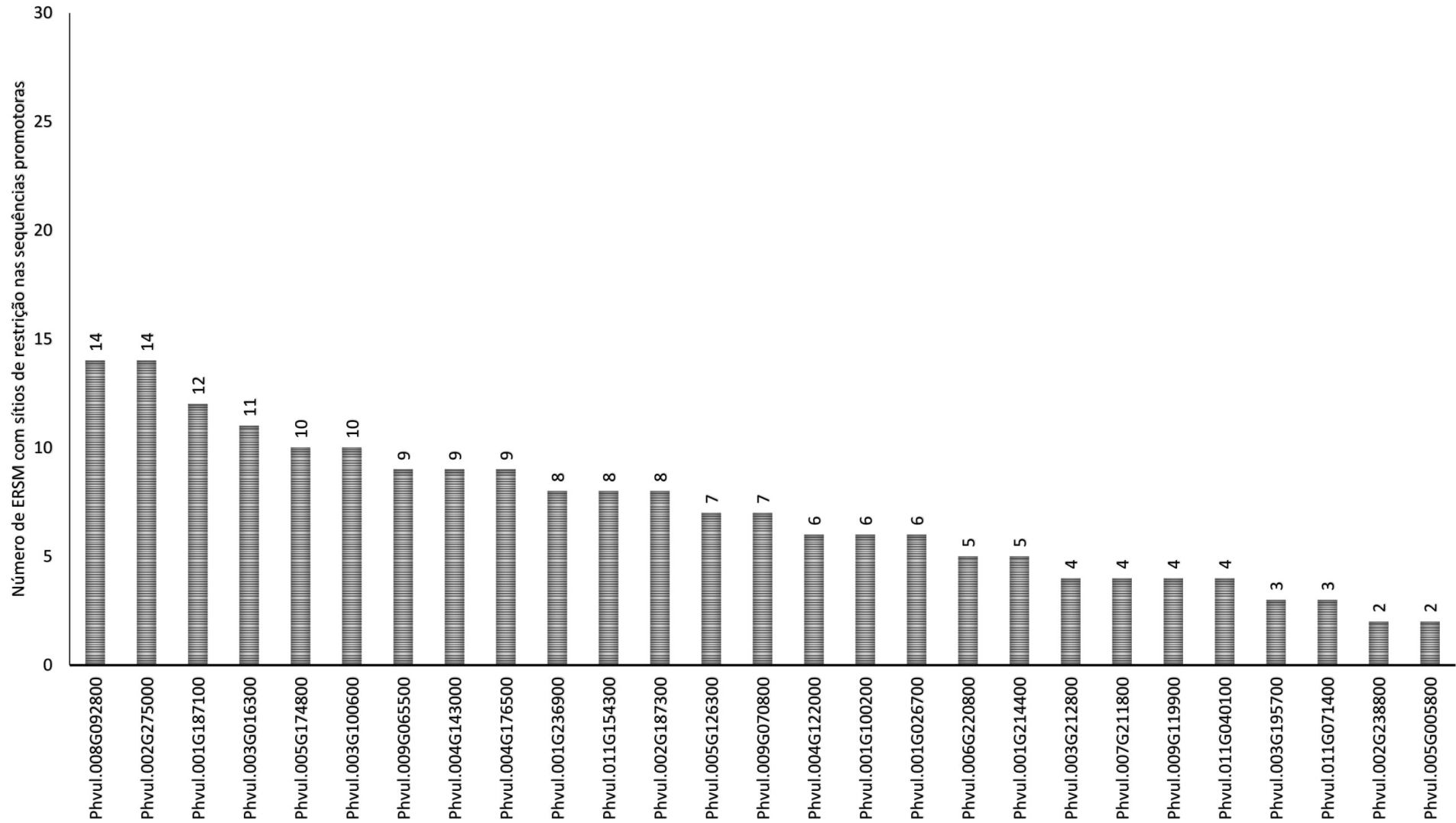


Figura 3 – Frequência de enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) com sítios de restrição nas sequências promotoras estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2016.

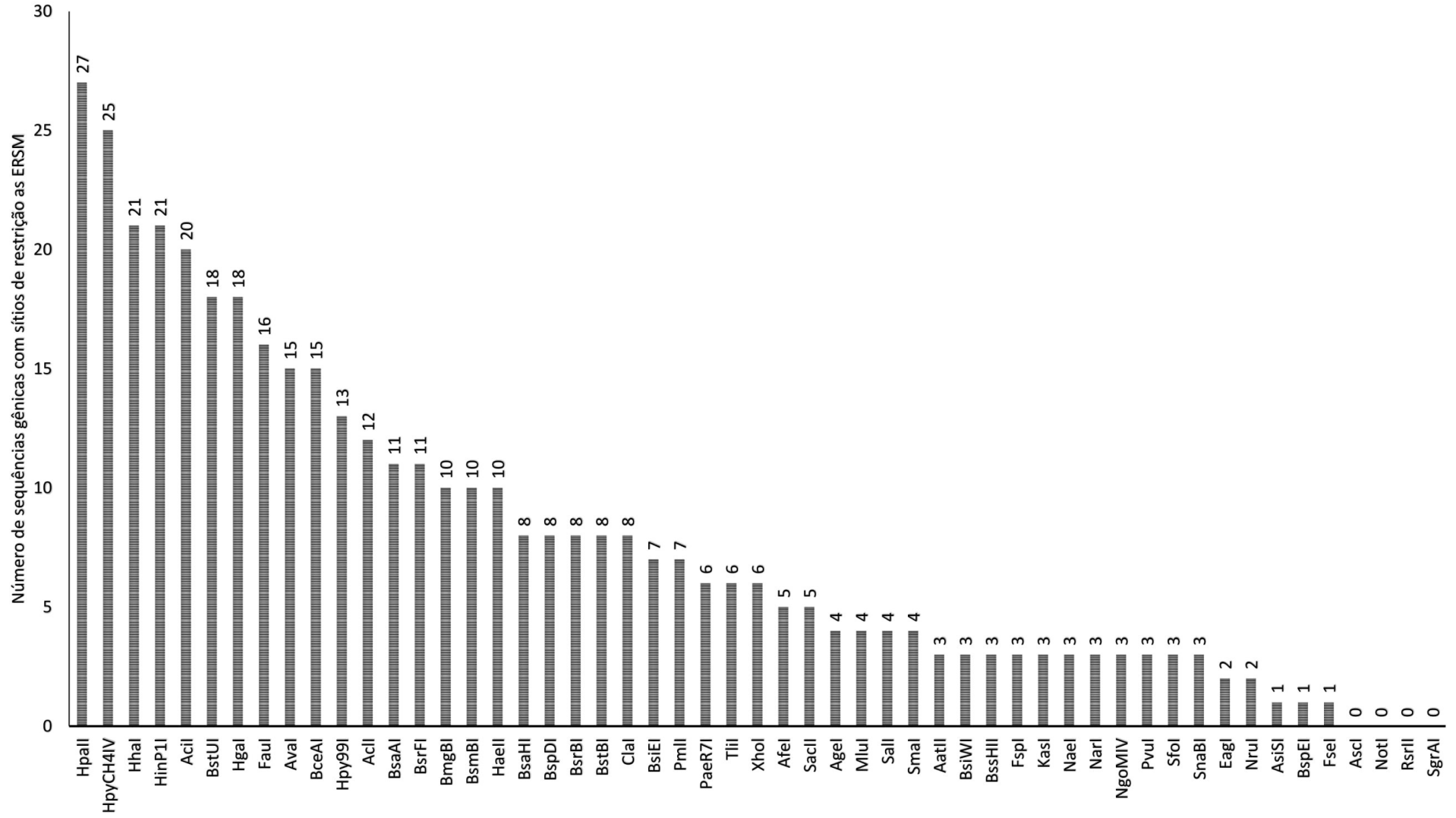


Figura 4 – Frequência de sequências gênicas com sítios de restrição das enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM) estudadas. Câmpus Pato Branco-PR, 2016.

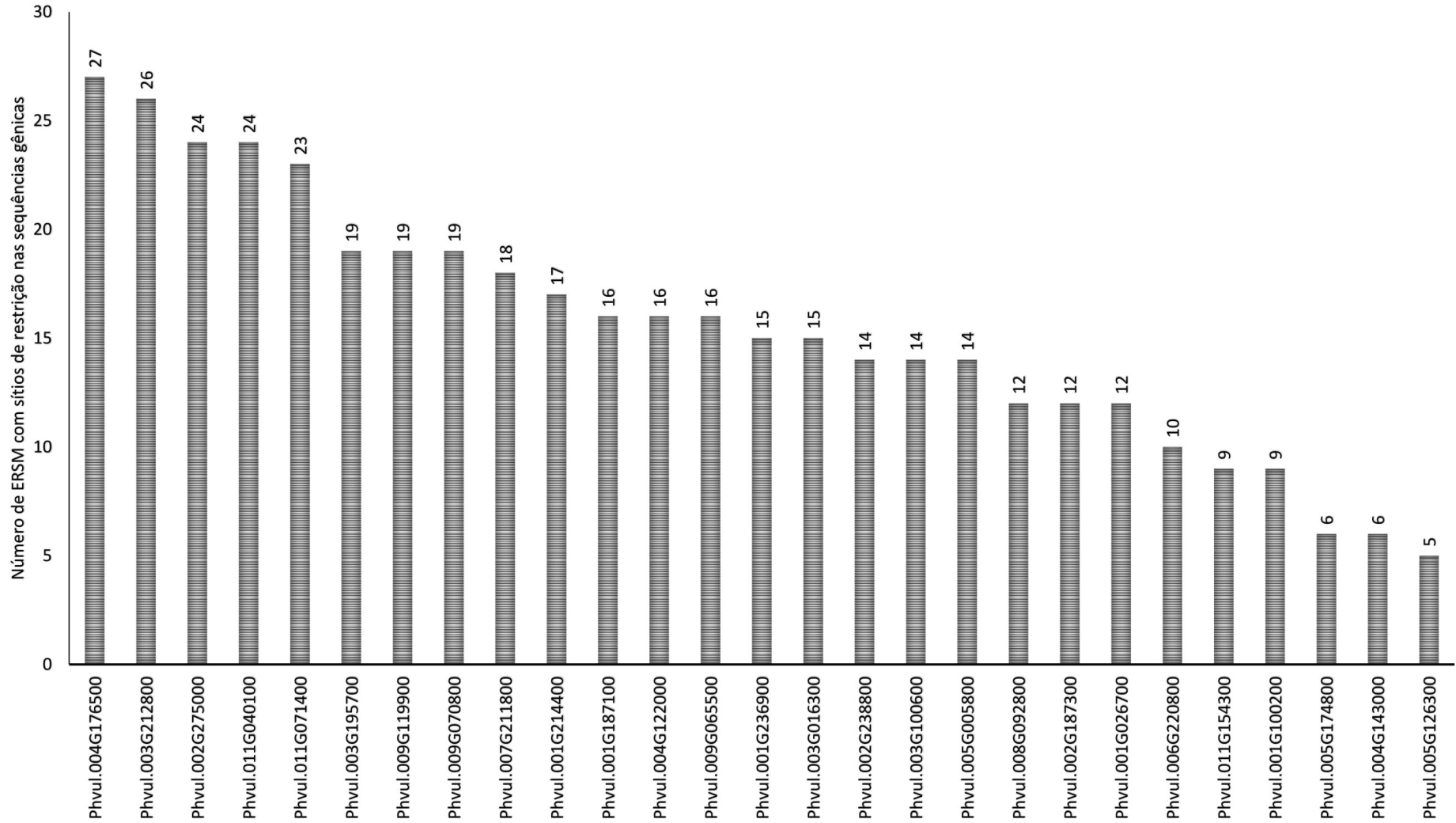


Figura 5 – Frequência de enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) com sítios de restrição nas sequências gênicas estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco-PR, 2016.

Das enzimas estudadas, *HpyCH4IV*, *Acil* e *HinP1I* reconheceram respectivamente 49, 37 e 32 sítios de restrição nas sequências gênicas e promotoras estudadas, já as enzimas *AclI*, *NotI*, *RsrII* e *SgrAI* não reconheceram nenhum sítio de restrição, tanto para promotores quanto para genes. A enzima *HpaII*, apresentou 27 sítios de restrição e já foi utilizada em trabalhos com soja (*Glycine max*) realizados por Gottlob-McHugh et al. (1990) e em trabalhos com *Arabidopsis thaliana* relacionados com expressão gênica e estado de metilação de genes específicos que foram descritos por Zhang et al. (2008), Guerrero-Bosagna (2013) e Cao e Jacobsen (2002). Xiong et al. (1999) utilizou esta enzima em estudos com arroz (*Oryza sativa* ssp. *Indica*). Schumacher et al. (2006) utilizaram um conjunto de enzimas dentre elas *HpaII*, *Hin6I*, *Acil* e *HpyCH4IV* em análises combinadas de ERSM e microarranjos. Rabinowicz e Bennetzen (2006) sugerem o uso de ERSM como ferramentas adicionais para análise de uma gama de espécies referenciando ainda as enzimas *HpaII* e *HpyCH4IV*.

Analisando conjuntamente, estes dados a ERSM *HpyCH4IV* com sítio de restrição A↓CGT apresentou a maior frequência nas sequências promotoras, e para os genes, foi a segunda ERSM com maior número de sítios de restrição, sendo para este trabalho relevante esta abrangência tanto em promotores quanto em genes.

5.3 DESENHO DE PRIMERS

De posse do sítio de restrição da ERSM *HpyCH4IV* na sequência de aminoácidos estudada, foram desenhados os *primers*, de modo que o sítio estivesse contido no fragmento amplificado.

Foram desenhados em duas sequências promotoras – locos *Phvul.001G187000* (*Primer 1*) e *Phvul.005G126300* (*Primer 3*), que correspondem ao fator de transcrição da família *AP2/ERF*; e cinco sequências gênicas – locos *Phvul.001G187000* (*Primer 2*), *Phvul.005G126300* (*Primer 4*), *Phvul.002G275000* (*Primer 5*), *Phvul.009G070800* (*Primer 6*) e *Pvul.001G026700* (*Primer 7*). Os *primers* desenhados apresentaram tamanhos de *amplicon* que variaram de 149 a 555 pb, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Denominação dos *primers*, tipo de sequência, seu loco, função, sequência de aminoácidos e tamanho do fragmento amplificado. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.

Primer	Tipo de Sequência	Loco	Função do Gene (Proteína Codificada)	Sequência de aminoácidos		Tamanho do fragmento amplificado (pb ¹)
				Forward	Reverse	
1	Promotora	<i>Phvul.001G187100</i>	<i>AP2 domain – transcription factor</i>	AAAAGCCCTTCAACCCCTAA	GCTGCTGCATTGGTATCAGA	392
2	Gênica	<i>Phvul.001G187100</i>	<i>AP2 domain – transcription factor</i>	TAGCGGAAAATGGGTTTCTG	GGAAGAGAAGAGGCGGAGTT	168
3	Promotora	<i>Phvul.005G126300</i>	<i>AP2 domain – transcription factor</i>	CGGATCATGTCTCAAGCAAA	GAAAAAGCACGAGGAAAACG	517
4	Gênica	<i>Phvul.005G126300</i>	<i>AP2 domain – transcription factor</i>	CACCATTTCAAGCAGAAGCA	CAACAGCCTCCAGTGAACAA	426
5	Gênica	<i>Phvul.002G275000</i>	<i>No apical meristem (NAM) protein – transcription factor</i>	GCTCATGGCCGTTGTATTTT	TTGTCACTGCTTTCGTCACC	326
6	Gênica	<i>Phvul.009G070800</i>	<i>Not family named</i>	TTATGGCACGTTGGGTTACA	AATCCCGATTCCCTCCATTTT	555
7	Gênica	<i>Phvul.001G026700</i>	<i>Not family named</i>	AAAGGGTCGGCTGAAAAGAT	TTTTGAGGGGAATTTGTTGG	149

¹ pares de bases.

O loco *Phvul.005G126300* (Primer 3), apresentado na Tabela 2, para a região promotora foi a que apresentou maior número de ERSM com sítios de restrição, e por ser um fator de transcrição o conhecimento da presença de citosinas metiladas ou da desmetilação da citosina é de muita importância, tipicamente a metilação do DNA conduz a uma expressão gênica reduzida (YAISH et al., 2011).

5.4 ANÁLISE DOS PADRÕES DE METILAÇÃO COM ERSM E PCR

As amostras de DNA extraído das folhas atendeu os parâmetros de integridade verificados em gel de agarose e também a quantidade verificada em espectrofotômetro, sendo possível dar continuidade e proceder a digestão do DNA com a enzima *HpyCH4IV*.

Na condição de 50 e 75% da capacidade de campo, não foram observadas alterações no padrão de metilação para nenhum dos genótipos estudados (Figura 6 A, B, C, D e E), ou seja, as sequências gênicas e promotoras encontravam-se metiladas, pois a enzima não clivou o DNA, já para a condição de 25% da CC houve alteração do padrão de metilação nas duas sequências promotoras estudadas. Para a cultivar IPR Curió, houve a desmetilação do DNA no promotor do gene *Phvul.001G187100*, que codifica o fator de transcrição *AP2/ERF* (Figura 6A), já a cultivar IAC Imperador apresentou desmetilação para o promotor do gene *Phvul.005G126300* que também codifica o fator de transcrição pertencente à família *AP2/ERF* (Figura 6C), a desmetilação é indicada pela ausência da banda de tamanho esperado (*amplicon*) indicado na Tabela 2. A presença de metilação do DNA em regiões promotoras, bem como nas regiões gênicas, permite a existência do gene em um estado reprimido, o que também indica que a redução na metilação nestas regiões conduza a um aumento da expressão gênica (SAHU et al., 2013).

Em arroz, a maior parte das proteínas *AP2/ERF* que estão envolvidas na resposta aos estresses bióticos e abióticos pertencem as subfamílias *ERF* e *DREB* e em estudos em *Arabidopsis*, tabaco e tomate indicaram que a indução a superexpressão dos genes *ERF* conferem resistência a patógenos como fungos e bactérias, entretanto, estudos recentes em arroz revelam que a indução a superexpressão de *OsBIERF-2* (*Benzothiadiazole-induced ERF 2*) aumentou a tolerância à seca, salinidade e baixas temperaturas, indicando que algumas proteínas *ERF* conferem tolerância também a estresses abióticos (SANTOS et al., 2011). Fatores de transcrição *DREB* tem um papel crucial em resposta a estresses abióticos e bióticos, Chen et al. (2007) mostrou que a expressão de *GmDREB2* foi induzido pela exposição a seca, *DREB2A* e *DREB2B* são induzidos pela seca e salinidade, porém o estresse por frio não induz sua expressão (WANG, 2008). A indução da expressão dos fatores de transcrição *DREB/CBF* aumentaram a tolerância ao frio e a seca em *Arabidopsis*, em tomate e arroz (MAZZUCOTELLI et

al., 2008). FTs da subfamília DREB tem sido estudados em muitas plantas, como *Arabidopsis*, arroz, trigo, tomate e cevada, devido que o aumento na expressão destes FTs aumentam a tolerância aos estresses abióticos, como a seca (SANTOS et al., 2011).

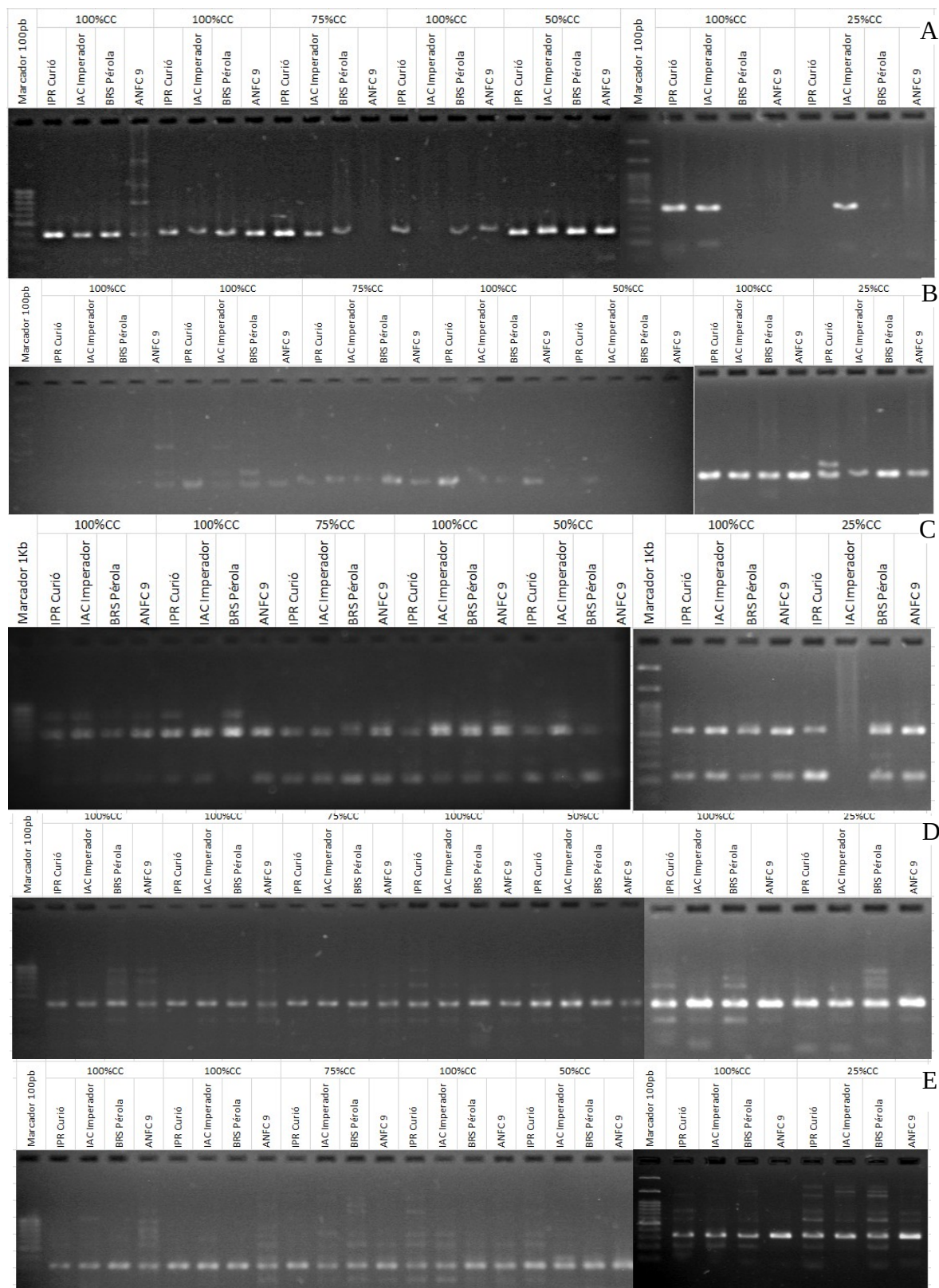


Figura 6 – Gel de Agarose 1,8% com os produtos da PCR para os *primers* testados. Onde A corresponde ao *primer* 1 (Sequência promotora do loco *Phvul.001G187100*) com tamanho de *amplicon* 342 pb, B ao *primer* 2 (Sequência gênica do loco *Phvul.001G187100*) com tamanho de *amplicon* 168 pb, C *primer* 3 (Sequência promotora do loco *Phvul.005G126300*) com tamanho de *amplicon* 517 pb, D *primer* 4 (Sequência gênica do loco *Phvul.005G126300*) com tamanho de *amplicon* 426 pb e E *primer* 5 (Sequência promotora do loco *Phvul.002G275000*) com tamanho de *amplicon* 326 pb. Foi utilizado o marcador de 100pb marca Kasvi®.

5.5 ANÁLISE DE MATÉRIA SECA E ACÚMULO DE PROLINA

Os quadrados médios resultantes da análise de variância para a análise de matéria fresca e seca (raiz e parte aérea) e concentração de prolina estão apresentados na Tabela 3. Exceto para o caractere MSF, para os demais foram encontradas diferenças significativas entre as condições controle e estressada e entre cultivares conforme apresentado na Tabela 3, entre as cultivares e as capacidades de campo todos os caracteres apresentaram significância ($p=0,05$).

Tabela 3 – Resumo da análise de variância da massa fresca e seca acumulada em raízes e parte aérea e acúmulo de prolina nas folhas, das cultivares de feijão IPR Curió, IAC Imperador, Pérola e ANFC 9, em resposta ao déficit hídrico de 100 (controle), 75, 50 e 25% da capacidade de campo no vegetativo V2. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Variáveis	GL	Quadrado Médio				
		MFR	MSR	MFPA	MSPA	Prolina (ug/mL)
Condição	1	8,4*	0,92*	2,45*	0,002 ^{ns}	11,74*
Cultivar	3	2,25*	0,58*	2,25*	0,02*	6,12*
Capacidade de Campo	2	14,01*	6,21*	0,63*	0,1*	13,6*
Bloco	2	0,84 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,003 ^{ns}	0,36*
Condição * Capacidade de Campo	2	2,33*	0,39*	1,03*	0,01 ^{ns}	21,72*
Cultivar * Capacidade de Campo	6	0,82*	0,28*	0,15 ^{ns}	0,01 ^{ns}	2,74*
Condição * Cultivar	3	0,21 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,003 ^{ns}	1,15*
Condição * Cultivar * Capacidade de Campo	6	0,51 ^{ns}	0,34*	0,21 ^{ns}	0,005 ^{ns}	1,69*
Resíduo	46	0,31	0,12	0,18	0,007	0,04
CV (%)	-	23,43	30,92	19,17	37,81	7,38

(*) significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p < 0,05$); (^{ns}) não significativo ($p \geq 0,05$).

Já para as interações entre os fatores, observa-se que há interação entre condição (controle e estressado) e capacidade de campo para os caracteres MFR, MSR, MFPA e acúmulo de prolina. Apenas para MSR e para acúmulo de prolina houve interação significativa entre todos os fatores ($P=0,05$).

Na análise de comparação de médias (Tabela 4), as cultivares IAC Imperador e Pérola para MFR em 25% da CC não diferiram do controle. Em 50% da

CC, IPR Curió, que diferiu estatisticamente de IAC Imperador apresentando 3,70g de MFR. Ainda, de acordo com a Tabela 4, para o caractere MFPA, a cultivar IAC Imperador na condição de 25 % da capacidade de campo não diferiu estatisticamente da condição controle. IPR Curió não diferiu do controle na condição de 75% da CC para MSPA, sendo assim mesmo sob estresse moderado as demais cultivares apresentaram decréscimo para MSPA na condição de déficit hídrico em relação ao controle. A cultivar IAC Imperador não obteve diferença de MSPA em nenhuma das capacidades de campo analisadas, sugerindo que esta cultivar manteve os processos fisiológicos, a tolerância à seca por esta via pode ser explicada por manter níveis elevados de água durante este período (FANG; XIONG, 2014). Em nenhum dos caracteres avaliados, na condição de 25 % da CC houve diferença entre as cultivares.

Para MSR como pode ser observado na Figura 7, para a cultivar IPR Curió em 50% da CC apresentou maior MSR em relação a condição de controle, apresentando ainda o maior valor entre as cultivares neste tratamento. Para IAC Imperador, em 25% da capacidade de campo a condição de déficit hídrico maior MSR em relação ao controle. Entre as cultivares, ANFC 9 apresentou o menor MS em relação as demais, entretanto em 75% da CC na condição de déficit hídrico apresentou um incremento bastante significativo em relação a condição de controle. O acúmulo de prolina nas folhas foi induzido pelo déficit hídrico, sendo maior concentração de prolina para todas as cultivares testadas em 25 % da CC em relação as demais CC, como observado na Figura 8. O acúmulo de prolina é relacionado com incremento na tolerância a seca, e a diferença no acúmulo de prolina entre cultivares destaca cultivares mais adaptadas ao estresse (MWENYE et al., 2016), sendo assim destacou-se a cultivar Pérola a qual apresentou maior acúmulo de prolina em relação as demais na condição de déficit hídrico em 25% da CC. Os resultados obtidos para a análise do padrão de metilação, indicam maior adaptação as cultivares IPR Curió e IAC Imperador, ambas aumentaram o acúmulo de prolina nas folhas com o aumento da severidade do estresse e em proporções semelhantes, e ainda IPR Curió apresentou resultados satisfatórios para o caractere MSR, o que pode estar relacionado com maior adaptação a este estresse abiótico e com a desmetilação do promotor do gene que codifica o FT AP2/ERF.

Tabela 4 – Comparação de médias da massa fresca acumulada em raiz, massa fresca e seca acumulada em parte aérea e acúmulo de prolina nas folhas, das cultivares de feijão IPR Curió, IAC Imperador, Pérola e ANFC 9, em resposta ao déficit hídrico de 100 (controle), 75, 50 e 25% da capacidade de campo no vegetativo V2. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016.

Cultivares	Controle*	75% da Capacidade de Campo		50% da Capacidade de Campo		25% da Capacidade de Campo	
	100%	Controle	Estresse	Controle	Estresse	Controle	Estresse
Massa Fresca de Raiz (g) - (MFR)							
IPR Curió	2,50 aA	3,09 aA	2,70 abA	3,41 aA	3,70 aA	2,57 abA	1,08 aB
IAC Imperador	1,86 abA	2,63 aA	1,79 bA	3,47 aA	2,09 bB	1,58 bA	0,96 aA
Pérola	1,72 abA	3,22 aA	3,00 aA	4,13 aA	2,94 abB	2,79 aA	1,06 aA
ANFC9	0,94 bA	2,65 aA	3,09 aA	3,44 aA	2,95 abA	2,81 aA	0,97 aB
Massa Fresca de Parte Aérea (g) - (MFPA)							
IPR Curió	2,14 aA	2 aA	1,98 abA	2,5 aA	2,37 aA	2,50 abA	1,59 aB
IAC Imperador	1,55 aA	2,16 aA	1,69 bA	2,51 aA	1,75 aB	2,04 bA	1,79 aA
Pérola	2,36 aA	2,72 aA	2,65 aA	2,91 aA	2,51 aA	3,38 aA	2,1 aB
ANFC9	2,23 aA	1,84 aA	2,02 abA	2,38 aA	2,59 aA	2,87 abA	1,59 aB
Massa Seca de Parte Aérea (g) - (MSPA)							
IPR Curió	0,11 aA	0,16 aA	0,35 aB	0,22 aA	0,19 aA	0,26 abA	0,24 aA
IAC Imperador	0,14 aA	0,11 aA	0,14 bA	0,20 aA	0,15 aA	0,17 bA	0,25 aA
Pérola	0,13 aA	0,25 aA	0,23 abA	0,27 aA	0,19 aA	0,35 aA	0,36 aA
ANFC9	0,16 aA	0,15 aA	0,16 bA	0,22 aA	0,25 aA	0,36 aA	0,35 aA

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, comparando a condição controle e condição de déficit hídrico. *Plantas hidratadas no dia em que iniciou a restrição hídrica.

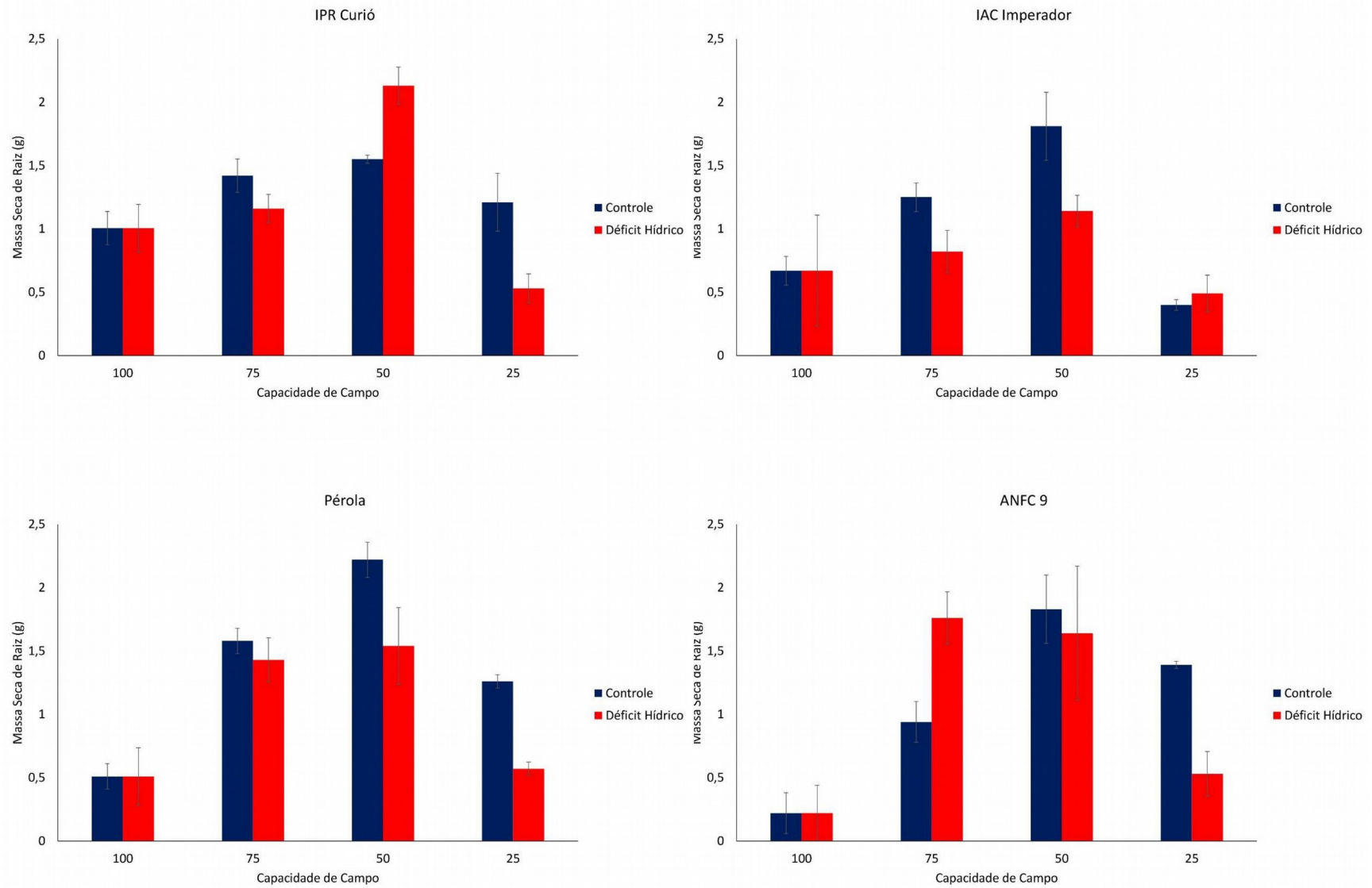


Figura 7 – Médias para MSR das cultivares IPR Curió (A), IAC Imperador (B); Pérola (C), ANFC 9 (D). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. As barras indicam o erro padrão da média.

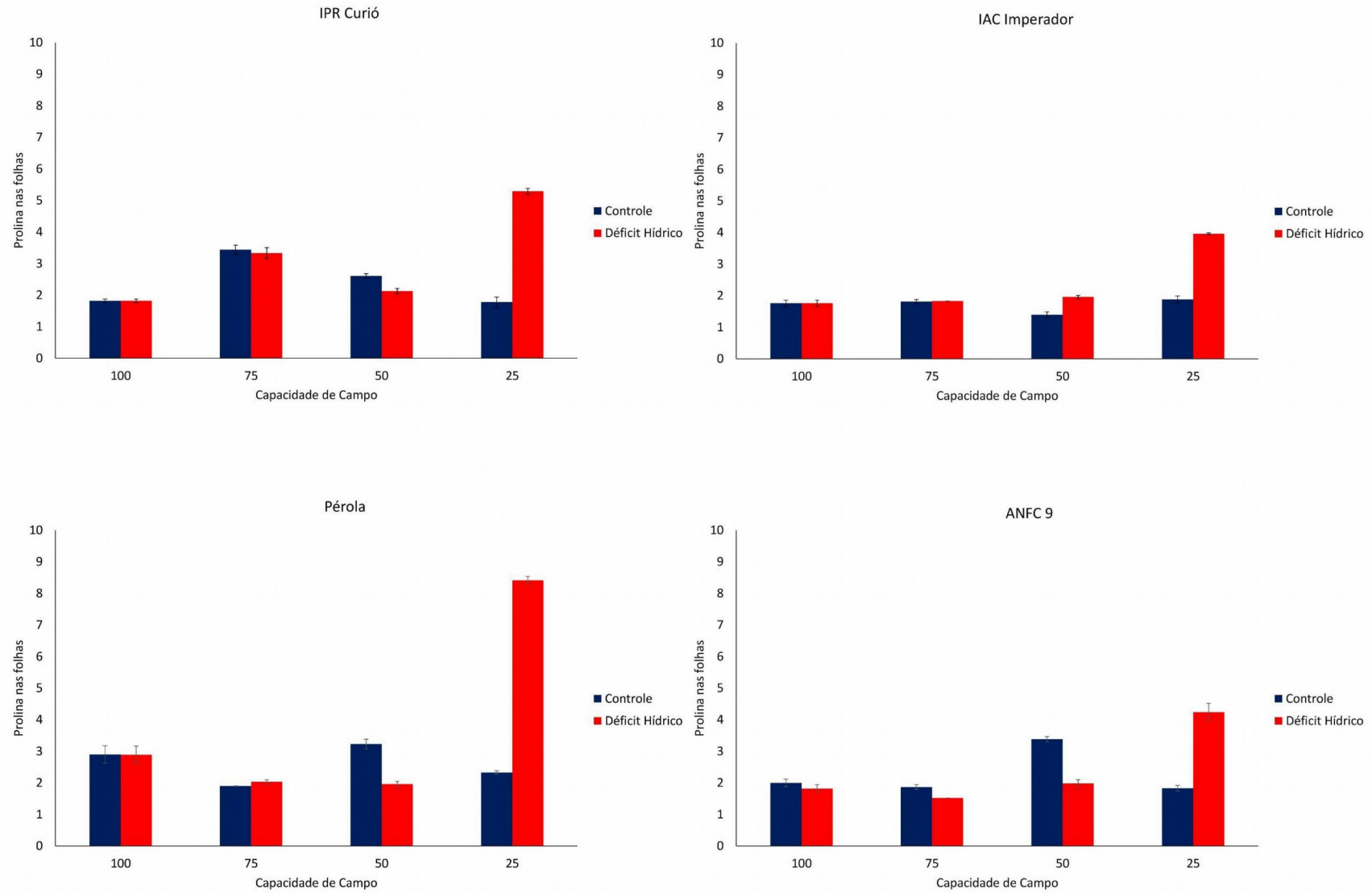


Figura 8 – Médias para acúmulo de Prolina das cultivares IPR Curió (A), IAC Imperador (B); Pérola (C), ANFC 9 (D). UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2016. As barras indicam o erro padrão da média.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste experimento com o objetivo de avaliar modificações no padrão de metilação do DNA do feijoeiro em resposta ao déficit hídrico, pode-se concluir que na condição de 25% da CC ocorre desmetilação no promotor do gene *Phvul.001G187100* para cultivar IPR Curió, e *Phvul.005G126300* para cultivar IAC Imperador, ambos codificam o fator de transcrição AP2/ERF. Nas demais capacidades de campo não são observadas alterações no padrão de metilação do DNA.

Na condição de 25% da capacidade de campo, ocorre aumento na MSR nas cultivares Pérola, IPR Curió e ANFC 9. IAC Imperador não apresenta diferença na MSR com o aumento da severidade do estresse.

Com o aumento da severidade do déficit hídrico todas as cultivares aumentaram os níveis de prolina nas folhas. As cultivares IPR Curió e IAC imperador, que apresentam desmetilação em promotores de genes que codificam AP2/ERF, tem comportamento semelhante para acúmulo de prolina nas folhas, em proporções similares, sendo assim, a desmetilação pode estar relacionada com o acúmulo de prolina para estes genótipos de modo a conferir maior adaptação ao déficit hídrico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste experimentos e para as análises realizadas, indicam que a desmetilação do DNA em especial de fatores de transcrição podem promover maior adaptação frente aos estresses abióticos, embora cada cultivar tenha respondido de forma distinta, indicando variabilidade de resposta e nos mecanismos de adaptação a este estresse. Contudo, mesmo em 25% da capacidade de campo, as sequencias de DNA dos genes mantiveram a metilação e em provável estado reprimido de expressão destes genes. A análise do padrão de metilação com outras enzimas com alta frequência nas sequências promotoras e gênicas estudadas, somado a análise de expressão gênica poderá trazer conclusões mais assertivas quanto o estado de metilação do DNA do feijão e o aumento de tolerância a seca.

O aumento no acúmulo de prolina para todas as cultivares indica maior capacidade de adaptação à seca, e a diferença encontrada entre as cultivares indica níveis de tolerância entre os genótipos, que é de grande importância para o melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Pradeep K.; AGARWAL Parinita, REDDY, M. K.; SOPORY, Sudhir K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant cell reports**, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, 2006.
- ANDRADE, C. A. de B.; PATRONI, S. M. S.; CLEMENTE, E.; SCAPIM, C. A. Produtividade e qualidade nutricional de cultivares de feijão em diferentes adubações. **Ciência e Agrometeorologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1077-1086, out. 2004.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205 - 207, ago. 1973.
- BRAY, Elizabeth A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, 2004.
- BRUCE, Toby J. A.; MATTHES, Michaela C.; NAPIER, Johnathan A.; PICKETT, John A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Science Direct**, v. 173, n.6, p. 603 - 608, dez. 2007.
- CAO, Xiaofeng; JACOBSEN, Steven E. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. **Current Biology**, v. 12, n. 13, p. 1138-1144, 2002.
- CARVALHO, Cristina V.; RICCI, Giannina; AFFONSE, Regina. **Guia de práticas em biologia molecular**. Yendis, 2010.
- CHEN, Ming; WANG, Qiao-Yan; CHENG, Xian-Guo; XU, Zhao-Shi; LI, Lian-Cheng; YE, Xing-Guo; XIA, Lan-Qin; MA, You-Zhi. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 2, p. 299-305, 2007.
- CHINNUSAMY, Viswanathan; ZHU, Jian-Kang. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 133-139, 2009.
- COELHO, José B. M. **Potencial osmótico, solutos orgânicos e comportamento hídrico do feijão vigna cultivado em solos salinizados**. 2012. 70 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. Disponível em: <http://200.17.137.108/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1545>. Acesso em 20 abr 2016.
- COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – safra 2015/2016**, v. 3, n. 7, abr 2016.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EMAM, Y., SHEKOOFA, A., SALEHI, F., JALALI, A. H. Water stress effects on two common bean cultivars with contrasting growth habits. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 9, n. 5, p. 495-499, 2010.

FANG, Yuije; XIONG, Lizhong. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673–689, fev. 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2011. **FAO discute demanda mundial por alimentos**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/FAOddma.asp>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2015 - **About the International Year of Pulses**. Disponível em: <<http://www.fao.org/pulses-2016/en/>>. Acesso em: 18 abr 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division), 2016. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em 19 abr 2016.

FUMIS, Terezinha de F.; PEDRAS, José F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 37, n. 4, p. 449 - 453. Abr. 2002.

GOTTLOB-MCHUGH, S.G., LÉVESQUE, M., MAKENZIE, K., OLSON, M., YAROSH, O., JOHNSON, D.A. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. **Genome**, v. 33, n. 4, p. 486-494, 1990.

GRANT-DOWNTON, R. T., DICKINSON, H.G. Epigenetics, Evolution and Beyond. **Annals of Botany**, v. 168, n. 1, p. 81 – 91, 23 jun. 2005.

GRATIVOL, Clícia; HEMERLY, Adriana S.; FERREIRA, Paulo C. G. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1819, p. 176 – 185, 2 set. 2011.

GUERRERO-BOSAGNA, Carlos. DNA Methylation Research Methods. **Labome**, 2015. Disponível em: <<http://www.labome.com/method/DNA-Methylation-Research-Methods.html>> Acesso em: 26 jun. 2016.

GUIMARÃES, Cleber M.; STONE, Luís F.; PELOSO, Maria J. D.; OLIVEIRA, Jaison P. de. Genótipos de feijoeiro comum sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 7, p. 649-656, 2011.

HERMAN, James G.; GRAFF, Jeremy R.; MYÖHÄNEN, Sanna; NELKIN, Barry D.; BAYLIN, Stephen B. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Medical science**, v. 93, n. 18, set. 1996.

HU, H.; XIONG, L.; Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, USA, v.65, p.715–41, 2014.

INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE. **About beans research**. Disponível em: < <https://ciat.cgiar.org/bean-research>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

JALEEL, Cheruth Abdul, MANIVANNAN, Paramasivam, WAHID, Abdul; FAROOQ, Muhammad; AL-JUBURU, Hameed J.; SOMASUNDARAM, Ramamurthy; PANNEERSELVAM, Rajaram. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **Int J Agric Biol**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.

JOHARI -PIREIVATLOU, M. Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.1, p. 36 - 40, 4 jan. 2010.

KIZIS, Dimosthenis; LUMBRERAS Victoria; PAGÈS Montserrat. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. **FEBS letters**, v. 498, n. 2-3, p. 187-189, 2001.

LATA, Charu; PRASAD, Manoj. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 14, p. 4731-4748, 2011.

LE, Tuan-Ngoc; SHUMANN, Ulrike; SITH, Neil A.; TIWARI, Sameer; AU, Phil A. K.; ZHU, Qian-Hao; TAYLOR, Jennifer M.; KAZAN, Kemal; LLEWELLYN, Danny J.; ZHANG, Ren; DENNIS, Elizabeth S.; WANG, Ming-Bo. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. **Genome biology**, v. 15, n. 9, p. 1, 2014.

LEFORT, François; DOUGLAS, Gerard C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, v. 56, n. 3, p. 259-263, 1 jan 1999.

LIMA, A. R.; CORREA, A. M. Avaliação do Ciclo de Florescimento e Maturação em Genótipos de Feijão Comum Cultivados em Aquidauana, MS. **ANAIS DO ENIC**, v. 1, n. 4, 2015.

LODHI, Muhammad A.; GUANG-NING, Ye; WEEDEN, Norman F.; REISH, Bruce I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, n. 1, p. 6-13, mar 1994.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows**: Winstat versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2003.

MAZZUCOTELLI, Elisabetta; MASTRANGELO, Anna M.; CROSATTI, Cristina; GUERRA, Davide; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, Luigi. Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v. 174, n. 4, p. 420-431, 2008.

MIROUZE, Maria; PASZKOWSKI, Jerzy. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. **Plant biology**, v. 14, n. 3, p. 267 – 274, jun. 2011.

MIZOI, Junya; SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 86-96, 2012.

MITSUDA, Nobutaka; OHME-TAKAGI, Masaru. Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 7, p. 1232-1248, 2009.

MWENYE, Obed J.; RENSBURG, Leon V.; BILJON, Angeline V.; MERWE, Rouxléne V. der. The role of proline and root traits on selection for drought-stress tolerance in soybeans: a review. **South African Journal of Plant and Soil**, p. 1-12, 2016.

NGUYEN, Henry T.; BABU, R. Chandra; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v. 37, n. 5, p. 1426-1434, 1997.

PARK, Peter J. ChIP – seq: advantages and challenges of a maturing technology. **Nature reviews**, v. 10, p. 669 – 680, 8 set 2009.

PEREIRA, J.W. DE L., MELO FILHO, P. DE A., ALBUQUERQUE, M.B., NOGUEIRA, R.J.M.C., SANTOS, R.C., 2012. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agrônômica**, v.43, p. 766–773, 2012.

PEREIRA, Vinicius G. C.; GRIS, Diego J.; MARANGONI, Thiago; FRIGO, Jianice P.; AZEVEDO, Késia D. de; GRZESIUK, Anderson E. Exigências agroclimáticas para a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, n. 1, p. 32 - 42, 2014.

PHYTOZOME - *Phaseolus vulgaris* v0.9, DOE-JGI and USDA-NIFA. Disponível em: <http://www.phytozome.net/commonbean>.

RABINOWICZ, Pablo D.; BENNETZEN, Jeffrey L. The maize genome as a model for efficient sequence analysis of large plant genomes. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 2, p. 149-156, 2006.

RAPP, Ryan R; WENDEL, Jonathan F. Epigenetics and plant evolution. **New phytologist**, v. 168, n.1, p. 81-91, 23 jun. 2005.

Restriction Mapper. Disponível em: <<http://www.restrictionmapper.org/>> Acesso em: 22 jan. 2016.

ROACH, Helmtrud. I.; HASHIMOTO, Ko. PCR-based methods to determine DNA methylation status at specific CpG sites using methylation-sensitive restriction enzymes. In: **Methods Express: PCR**, ed. S. Hughes and A. Moody, pp. 279–292. Bloxham, Oxfordshire, UK: Scion Publishing Ltd, 2007.

SAHU, Pranav P.; PANDEY, Garima; SHARMA, Namisha; PURANIK, Swati, MUTHAMILARASAN, Mehanathan; PRASAD, Manoj. Epigenetics mechanisms of plant stress responses and adaptation. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 8, p. 1151 - 1159, mai. 2013.

SAKUMA, Yoh; LIU, Qiang; DUBOUZET, Joseph G.; ABE, Hiroshi; SHINOZAKI, Kazuo, YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 3, p. 998-1009, 2002.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, Edward F.; MANIATIS, Tom.; Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.

SANTOS, A. P.; SERRA, T.; FIGUEREDO, D. D.; BARROS, P.; LOURENÇO, T.; CHANDER, S., OLIVEIRA, M. M.; SAIBO, N. J. M. Transcription regulation of abiotic stress responses in rice: a combined action of transcription factors and epigenetic mechanisms. **Omic: a journal of integrative biology**, v. 15, n. 12, p. 839-857, 2011.

SCHUMACHER, Axel; KAPRANOV, Phillipp; KAMISNKY, Zachary; FLANAGAN, James; ASSADZADEH, Abbas; YAU, Patrick; VIRTANE, Carl; WINEGARDEN, Neil, CHENG, Jill; GINGERAS, Thomas; PETRONIS, Arturas. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 2, p. 528-542, 2006.

SCHMUTZ, Jeremy; MCCLEAN, Phillip E.; MAMIDI, Sujana; WU, G Albert; CANNON, Steven B.; GRIMWOOD, Jane; JENKINS, Jerry; SHU, Shengqiang, SONG, Qijian; CHAVARRO, Carolina, TORRES-TORRES, Mirayda; GEFFROY, Valerie; MOGHADDAM, Samira M.; GAO, Dongying; ABERNATHY, Brian; BARRY, Kerrie; BLAIR, Matthew; BRICK, Mark A.; CHOVIATIA, Mansi; GEPTS, Paul; GOODSTEIN, David M.; GONZALES, Michael; HELLSTEN, Uffe; HYTEN, David L.; JIA, Gaofeng; KELLY, James D.; KUDRNA, Dave; LEE, Rian; RICHARD, Manon M. S.; MIKLAS, Phillip N.; OSORNO, Juan M.; RODRIGUES, Josiane; THAREAUS, Vicent; URREA, Carlos A.; WANG, Mei; YU, Yeisoo; ZHANG, Ming; WING, Rod A.; CREGAN, Perry B.; ROKHSAR, Daniel S.; JACKSON, Scott A. A reference genome for common bean

and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature genetics**, v. 46, n. 7, p. 707 - 716, 08 jul. 2014.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 2007.

SILVA, Flávia Barbosa; RAMALHO, Magno Antonio Patto; ABREU, A. de FB. Seleção recorrente fenotípica para florescimento precoce de feijoeiro 'Carioca'. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1437-1442, 2007.

SINGH, S. P. Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean, **Crop Science, Madison**, v. 35, p. 118 - 124, 1995

STOCKINGER, E.J., GILMOUR, S.J., THOMASHOW, M.F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeatDRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Plant Biology**, v. 94, p. 1035-1040, 1997.

TAN, M. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 21-26, 2010.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 25, p. 614-622.

UNTERGASSER, Andreas; NIJVEEN, Harm; RAO, Xiangyu; BISSELING, Ton, GEURTS, René; LEUNISSEN, Jack A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p 71 - 74, 7 mai 2007.

VENDRUSCULO, Eliane C. G.; SCHUSTER, Ivan; PILEGGI, Marcos; SCAPIM, Carlos A.; MOLINARI, Hugo B. C.; MARUR, Celso J.; VIEIRA, Luiz G. E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal Plant Physiology**, v. 164, n. 10, p. 1367 - 1376, 19 out 2007.

WANG, Q.; GUAN, Y.; WU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; CHU, C. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. **Plant molecular biology**, v. 67, n. 6, p. 589-602, 2008.

WHITE, Jeffrey. W. **Implications of carbon isotope discrimination studies for breeding common bean under water déficits**. In: EHLRINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D.; SAUGIE, B. (Ed.). Stable isotopes and plant carbon-water relations. San Diego: Academic Press, 1993. p. 387-398.

XIONG, L. Z.; XU, C. G.; MAROOF, M. A. S.; ZHANG, Q. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental .lines, detected by a methylation-

sensitive amplification polymorphism technique. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 3, p. 439-446, 1999.

YAISH, Mahmoud W.; COLASANTI, Joseph; ROTHSTEIN, Steven J. The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3727-3735, 2011

ZADRAŽNIK, Tanja; HOLLUNG, Kristin; EGGE-JACOBSEN, Wolfgang; MEGLIČ, Vladimir; ŠUŠTAR-VOZLIČ, Jelka. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of proteomics**, v. 78, p. 254-272, 2013.

ZHANG, Xu, SHIU, Shin-Han, CAL, Andrew, BOREVITZ, Justin O. Global Analysis of Genetic, Epigenetic and Transcriptional Polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* Using Whole Genome Tiling Arrays. **PLOS Genetics**, v. 4, p. 1-12, 2008.

ZHONG, Ruiqin; YE, Zheng-Hua. Unraveling the functions of glycosyltransferase family 47 in plants. **Trends in plant science**, v. 8, n. 12, p. 565-568, 2003.

ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – Descrição das sequências promotoras com sítios de restrição as ERSM.....	52
APÊNDICE B – Descrição das ERSM com sítios de restrição as sequências promotoras estudadas.....	55
APÊNDICE C – Descrição das ERSM com sítios de restrição as sequências gênicas estudadas.....	57
APÊNDICE D – Descrição das sequências gênicas com sítios de restrição as ERSM	61
ANEXO A – Quadro da determinação da curva padrão para análise do acúmulo de prolina, pela qual será obtida a equação de determinação de prolina livre no tecido vegetal. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.....	64

APÊNDICES

APÊNDICE A – Descrição das sequências promotoras com sítios de restrição as ERSM

Enzima	Quantidade de genes nos quais reconhece sítios de restrição	Promotores
<i>AatII</i>	0	-
<i>Acil</i>	17	<i>Phvul.001G236900; Phvul.004G122000; Phvul.005G126300; Phvul.008G092800; Phvul.011G154300; Phvul.002G187300; Phvul.003G195700; Phvul.009G119900; Phvul.001G100200; Phvul.002G275000; Phvul.001G026700; Phvul.006G220800; Phvul.002G238800; Phvul.011G071400; Phvul.003G100600; Phvul.011G040100; Phvul.003G016300</i>
<i>AcII</i>	6	<i>Phvul.001G236900; Phvul.009G065500; Phvul.002G187300; Phvul.007G211800; Phvul.009G070800; Phvul.006G220800</i>
<i>AfeI</i>	1	<i>Phvul.005G174800</i>
<i>AgeI</i>	1	<i>Phvul.011G154300</i>
<i>AscI</i>	0	-
<i>AsiSI</i>	0	-
<i>AvaI</i>	3	<i>Phvul.009G065500; Phvul.007G211800; Phvul.011G071400</i>
<i>BceAI</i>	5	<i>Phvul.009G065500; Phvul.007G211800; Phvul.003G195700; Phvul.002G275000; Phvul.003G100600</i>
<i>BmgBI</i>	7	<i>Phvul.001G187100; Phvul.008G092800; Phvul.005G174800; Phvul.001G026700; Phvul.011G040100; Phvul.003G016300; Phvul.001G214400</i>
<i>BsaAI</i>	17	<i>Phvul.001G236900; Phvul.001G187100; Phvul.004G122000; Phvul.008G092800; Phvul.011G154300; Phvul.005G174800; Phvul.004G143000; Phvul.002G187300; Phvul.001G100200; Phvul.002G275000; Phvul.009G070800; Phvul.001G026700; Phvul.006G220800; Phvul.004G176500; Phvul.003G100600; Phvul.003G016300; Phvul.001G214400</i>
<i>BsaHI</i>	2	<i>Phvul.008G092800; Phvul.002G275000</i>
<i>BsiEI</i>	1	<i>Phvul.003G212800</i>
<i>BsiWI</i>	0	-
<i>BsmBI</i>	5	<i>Phvul.001G187100; Phvul.004G143000; Phvul.009G119900; Phvul.001G100200; Phvul.003G016300</i>
<i>BspDI</i>	9	<i>Phvul.001G236900; Phvul.001G187100; Phvul.004G122000; Phvul.008G092800; Phvul.009G065500; Phvul.002G187300; Phvul.001G026700; Phvul.004G176500; Phvul.005G005800</i>
<i>BspEI</i>	0	-
<i>BsrBI</i>	4	<i>Phvul.001G187100; Phvul.011G154300; Phvul.002G187300; Phvul.003G016300</i>

Continua ...

APÊNDICE A – Continuação

<i>BsrFI</i>	3	<i>Phvul.001G187100; Phvul.011G154300; Phvul.009G070800</i>
<i>BssHII</i>	1	<i>Phvul.002G275000</i>
<i>BstBI</i>	9	<i>Phvul.004G122000; Phvul.005G126300; Phvul.009G065500; Phvul.005G174800; Phvul.004G143000; Phvul.002G187300; Phvul.003G195700; Phvul.003G016300</i>
<i>BstUI</i>	9	<i>Phvul.001G236900; Phvul.005G126300; Phvul.004G143000; Phvul.002G275000; Phvul.011G071400; Phvul.004G176500; Phvul.003G100600; Phvul.011G040100; Phvul.003G016300</i>
<i>Clal</i>	9	<i>Phvul.001G236900; Phvul.001G187100; Phvul.004G122000; Phvul.008G092800; Phvul.009G065500; Phvul.002G187300; Phvul.001G026700; Phvul.004G176500; Phvul.005G005800</i>
<i>EagI</i>	0	-
<i>FauI</i>	2	<i>Phvul.011G154300; Phvul.003G100600</i>
<i>FseI</i>	0	-
<i>FspI</i>	1	<i>Phvul.002G275000</i>
<i>HaeIII</i>	3	<i>Phvul.008G092800; Phvul.005G174800; Phvul.004G176500</i>
<i>HgaI</i>	2	<i>Phvul.001G187100; Phvul.004G143000</i>
<i>HhaI</i>	11	<i>Phvul.001G187100; Phvul.005G126300; Phvul.008G092800; Phvul.009G065500; Phvul.005G174800; Phvul.004G143000; Phvul.002G275000; Phvul.009G070800; Phvul.004G176500; Phvul.003G100600; Phvul.003G016300</i>
<i>HinPII</i>	11	<i>Phvul.001G187100; Phvul.005G126300; Phvul.008G092800; Phvul.009G065500; Phvul.005G174800; Phvul.004G143000; Phvul.002G275000; Phvul.009G070800; Phvul.004G176500; Phvul.003G100600; Phvul.003G016300</i>
<i>HpaII</i>	0	-
<i>Hpy99I</i>	7	<i>Phvul.001G236900; Phvul.003G212800; Phvul.005G126300; Phvul.011G154300; Phvul.009G119900; Phvul.001G100200; Phvul.002G275000;</i>
<i>HpyCH4IV</i>	24	<i>Phvul.001G236900; Phvul.001G187100; Phvul.003G212800; Phvul.004G122000; Phvul.005G126300; Phvul.008G092800; Phvul.009G065500; Phvul.011G154300; Phvul.005G174800; Phvul.004G143000; Phvul.002G187300; Phvul.007G211800; Phvul.009G119900; Phvul.001G100200; Phvul.002G275000; Phvul.009G070800; Phvul.001G026700; Phvul.006G220800; Phvul.002G238800; Phvul.004G176500; Phvul.003G100600; Phvul.011G040100; Phvul.003G016300; Phvul.001G214400</i>
<i>KasI</i>	1	<i>Phvul.008G092800</i>
<i>MluI</i>	0	-

Continua ...

APÊNDICE A – Continuação

<i>NaeI</i>	0	-
<i>NarI</i>	1	<i>Phvul.008G092800</i>
<i>NgoMIV</i>	0	-
<i>NotI</i>	0	-
<i>NruI</i>	0	-
<i>PaeR7I</i>	0	-
<i>PmlI</i>	9	<i>Phvul.008G092800; Phvul.005G174800; Phvul.004G143000; Phvul.001G100200; Phvul.002G275000; Phvul.009G070800; Phvul.006G220800; Phvul.003G016300; Phvul.001G214400</i>
<i>PvuI</i>	0	-
<i>RsrII</i>	0	-
<i>SacII</i>	0	-
<i>SalI</i>	2	<i>Phvul.003G212800; Phvul.002G275000</i>
<i>SfoI</i>	1	<i>Phvul.008G092800</i>
<i>SgrAI</i>	0	-
<i>SmaI</i>	0	-
<i>SnaBI</i>	5	<i>Phvul.001G187100; Phvul.005G174800; Phvul.004G176500; Phvul.003G100600; Phvul.001G214400</i>
<i>TliI</i>	0	-
<i>XhoI</i>	0	-

APÊNDICE B – Descrição das ERSM com sítios de restrição as sequências promotoras estudadas.

Promotores	Quantidade de enzimas de restrição	Enzimas
<i>Phvul.001G236900</i>	8	<i>Acil, AclI, BsaI, BspDI, BstUI, ClaI, Hpy99I, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.001G187100</i>	12	<i>BmgBI, BsaAI, BsmBI, BspEI, BsrBI, BsrFI, ClaI, Hgal, HhaI, HinP1I, HpyCH4IV, SnaBI</i>
<i>Phvul.003G212800</i>	4	<i>BsiEI, Hpy99I, HpyCh4IV, SalII</i>
<i>Phvul.004G122000</i>	6	<i>Acil, BsaAI, BspDI, BstBI, ClaI, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.005G126300</i>	7	<i>Acil, BstBI, BstUI, HhaI, HinP1I, Hpy99I, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.008G092800</i>	14	<i>Acil, BmgBI, BsaAI, BsaHI, BspDI, ClaI, Haell, HhaI, HinP1I, HpyCh4IV, KasI, NarI, PmlI, SfoI</i>
<i>Phvul.009G065500</i>	9	<i>AclI, Aval, BceAI, BspDI, BstBI, ClaI, HhaI, HinP1I, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.011G154300</i>	8	<i>Acil, AgeI, BsaAI, BsrBI, BsrFI, Faul, Hpy99I, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.005G174800</i>	10	<i>AfeI, BmgBI, BsaAI, BstBI, Haell, HhaI, HinP1I, HpyCh4IV, PmlI, SnaBI</i>
<i>Phvul.004G143000</i>	9	<i>BsaAI, BsmBI, BstBI, BstUI, Hgal, HhaI, Hinp1I, HpyCh4IV, PmlI</i>
<i>Phvul.002G187300</i>	8	<i>Acil, AclI, BsaAI, BspDI, BsrBI, BstBI, ClaI, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.007G211800</i>	4	<i>AclI, Aval, BceAI, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.003G195700</i>	3	<i>Acil, BceAI, BstBI</i>
<i>Phvul.009G119900</i>	4	<i>Acil, BsmBI, Hpy99I, HpyCh4IV</i>
<i>Phvul.001G100200</i>	6	<i>Acil, BsaAI, BsmBI, Hpy99I, HpyCH4IV, PmlI</i>
<i>Phvul.002G275000</i>	14	<i>Acil, BceAI, BsaAI, BsaHI, BssHII, BstBI, BstUI, FspI, HhaI, HinP1I, Hpy99I, HpyCh4IV, PmlI, SalII</i>
<i>Phvul.009G070800</i>	7	<i>Acil, BsaAI, BsrFI, HhaI, HinP1I, HpyCH4IV, PmlI</i>
<i>Phvul.001G026700</i>	6	<i>Acil, BmgBI, BsaAI, BspDI, ClaI, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.006G220800</i>	5	<i>Acil, AclI, BsaAI, HpyCH4IV, PmlI</i>
<i>Phvul.002G238800</i>	2	<i>Acil, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.011G071400</i>	3	<i>Acil, Aval, BstUI</i>
<i>Phvul.004G176500</i>	9	<i>BsaAI, BspDI, BstUI, ClaI, Haell, HhaI, HinP1I, HpyCH4IV, SnaBI</i>
<i>Phvul.003G100600</i>	10	<i>Acil, BceAI, BsaAI, BstUI, Faul, HhaI, HinP1I, HpyCH4IV, SnaBI</i>

Continua ...

APÊNDICE B – Continuação

<i>Phvul.011G040100</i>	4	<i>Acil, BmgBI, BstUI, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.003G016300</i>	11	<i>Acil, BmgBI, BsaAI, BsmBI, BsrBI, BstBI, BstUI, HhaI, HinP1I, HpyCH4IV, PmlI</i>
<i>Phvul.005G005800</i>	2	<i>BspDI, ClaI</i>
<i>Phvul.001G214400</i>	5	<i>BmgBI, BsaAI, HpyCH4IV, PmlI, SnaBI</i>

APÊNDICE C – Descrição das ERSM com sítios de restrição as sequências gênicas estudadas.

Enzima	Quantidade de genes nos quais reconhece sítios de restrição	Genes
<i>AatII</i>	3	<i>Phvul.001G187100, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500</i>
<i>Acil</i>	20	<i>Phvul.001G236900, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.005G126300, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.011G154300, Phvul.005G174800, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.001G100200, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.006G220800, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800, Phvul.001G214400</i>
<i>AclI</i>	12	<i>Phvul.001G236900, Phvul.003G212800, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.001G100200, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.006G220800, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100,</i>
<i>AfeI</i>	5	<i>Phvul.001G187100, Phvul.001G100200, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100</i>
<i>AgeI</i>	4	<i>Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600</i>
<i>AscI</i>	0	-
<i>AsiSI</i>	1	<i>Phvul.003G212800</i>
<i>AvaI</i>	15	<i>Phvul.001G236900, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.008G092800, Phvul.004G143000, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.002G275000, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800,</i>
<i>BceAI</i>	15	<i>Phvul.003G212800, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.011G154300, Phvul.005G174800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.006G220800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800,</i>
<i>BmgBI</i>	10	<i>Phvul.005G126300, Phvul.011G154300, Phvul.007G211800, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.006G220800, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800,</i>
<i>BsaAI</i>	11	<i>Phvul.001G236900, Phvul.003G212800, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.001G100200, Phvul.002G275000, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.001G214400</i>
<i>BsaHI</i>	8	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.009G065500, Phvul.009G070800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.001G214400</i>
<i>BsiEI</i>	7	<i>Phvul.003G212800, Phvul.002G187300, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.004G176500, Phvul.005G005800</i>

Continua...

APÊNDICE C – Continuação

<i>BsiWI</i>	3	<i>Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500,</i>
<i>BsmBI</i>	10	<i>Phvul.004G122000, Phvul.008G092800, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.011G071400, Phvul.001G214400</i>
<i>BspDI</i>	8	<i>Phvul.008G092800, Phvul.011G154300, Phvul.003G195700, Phvul.002G275000, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800, Phvul.001G214400</i>
<i>BspEI</i>	1	<i>Phvul.009G070800,</i>
<i>BsrBI</i>	8	<i>Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.006G220800, Phvul.011G071400, Phvul.005G005800</i>
<i>BsrFI</i>	11	<i>Phvul.003G212800, Phvul.009G065500, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.001G214400</i>
<i>BssHII</i>	3	<i>Phvul.004G176500, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300,</i>
<i>BstBI</i>	8	<i>Phvul.001G236900, Phvul.001G187100, Phvul.004G143000, Phvul.009G119900, Phvul.006G220800, Phvul.002G238800, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100</i>
<i>BstUI</i>	18	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.005G174800, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.001G214400,</i>
<i>Clal</i>	8	<i>Phvul.008G092800, Phvul.011G154300, Phvul.003G195700, Phvul.002G275000, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800, Phvul.001G214400</i>
<i>EagI</i>	2	<i>Phvul.002G275000, Phvul.004G176500</i>
<i>FauI</i>	16	<i>Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.009G065500, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.006G220800, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300</i>
<i>FseI</i>	1	<i>Phvul.009G119900</i>
<i>FspI</i>	3	<i>Phvul.001G236900, Phvul.004G143000, Phvul.011G040100</i>
<i>HaeIII</i>	10	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.009G065500, Phvul.009G119900, Phvul.001G100200, Phvul.009G070800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100,</i>

Continua...

APÊNDICE C – Continuação

<i>HgaI</i>	18	<i>Phvul.001G236900, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.006G220800, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.001G214400</i>
<i>HhaI</i>	21	<i>Phvul.001G236900, Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.009G065500, Phvul.011G154300, Phvul.005G174800, Phvul.004G143000, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.001G100200, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.001G214400</i>
<i>HinP1I</i>	21	<i>Phvul.001G236900, Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.009G065500, Phvul.011G154300, Phvul.005G174800, Phvul.004G143000, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.001G100200, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.001G214400</i>
<i>HpaII</i>	27	<i>Phvul.001G236900, Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.005G126300, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.011G154300, Phvul.005G174800, Phvul.004G143000, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.001G100200, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.006G220800, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800, Phvul.001G214400,</i>
<i>Hpy99I</i>	13	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.005G126300, Phvul.009G065500, Phvul.003G195700, Phvul.002G275000, Phvul.001G026700, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.011G040100, Phvul.005G005800, Phvul.001G214400</i>
<i>HpyCH4IV</i>	25	<i>Phvul.001G236900, Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.004G122000, Phvul.005G126300, Phvul.008G092800, Phvul.009G065500, Phvul.011G154300, Phvul.002G187300, Phvul.007G211800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900, Phvul.001G100200, Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.001G026700, Phvul.006G220800, Phvul.002G238800, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600, Phvul.011G040100, Phvul.003G016300, Phvul.005G005800, Phvul.001G214400</i>
<i>KasI</i>	3	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.009G070800</i>
<i>MluI</i>	4	<i>Phvul.002G275000, Phvul.009G070800, Phvul.011G071400, Phvul.001G214400</i>
<i>NaeI</i>	3	<i>Phvul.003G212800, Phvul.009G065500, Phvul.009G119900,</i>
<i>NarI</i>	3	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.009G070800</i>
<i>NgoMIV</i>	3	<i>Phvul.003G212800, Phvul.009G065500, Phvul.009G119900,</i>
<i>NotI</i>	0	-

Continua ...

APÊNDICE C – Continuação

<i>NruI</i>	2	<i>Phvul.008G092800, Phvul.002G238800</i>
<i>PaeR7I</i>	6	<i>Phvul.001G236900, Phvul.004G122000, Phvul.002G187300, Phvul.002G275000, Phvul.011G040100, Phvul.005G005800</i>
<i>PmII</i>	7	<i>Phvul.001G236900, Phvul.003G212800, Phvul.007G211800, Phvul.002G275000, Phvul.011G071400, Phvul.004G176500, Phvul.003G100600</i>
<i>PvuI</i>	3	<i>Phvul.003G212800, Phvul.003G195700, Phvul.009G119900,</i>
<i>RsrII</i>	0	-
<i>SacII</i>	5	<i>Phvul.001G187100, Phvul.004G122000, Phvul.001G026700, Phvul.002G238800, Phvul.004G176500</i>
<i>SalI</i>	4	<i>Phvul.003G212800, Phvul.002G187300, Phvul.004G176500, Phvul.001G214400</i>
<i>SfoI</i>	3	<i>Phvul.001G187100, Phvul.003G212800, Phvul.009G070800</i>
<i>SgrAI</i>	0	-
<i>SmaI</i>	4	<i>Phvul.007G211800, Phvul.002G275000, Phvul.003G100600, Phvul.003G016300</i>
<i>SnaBI</i>	3	<i>Phvul.002G275000, Phvul.011G071400, Phvul.001G214400</i>
<i>TliI</i>	6	<i>Phvul.001G236900, Phvul.004G122000, Phvul.002G187300, Phvul.002G275000, Phvul.011G040100, Phvul.005G005800</i>
<i>XhoI</i>	6	<i>Phvul.001G236900, Phvul.004G122000, Phvul.002G187300, Phvul.002G275000, Phvul.011G040100, Phvul.005G005800</i>

APÊNDICE D – Descrição das sequências gênicas com sítios de restrição as ERSM

Gene	Quantidade de enzimas de restrição	Enzimas
<i>Phvul.001G236900</i>	15	<i>Acil, AclI, Aval, BsaAI, BstBI, FspI, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, HpyCH4IV, PaeR7I, PmlI, TliI, XhoI</i>
<i>Phvul.001G187100</i>	16	<i>AatII, Acil, Afel, BsaHI, BstBI, BstUI, HaeII, HhaI, HinP1I, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, KasI, NarI, SacII, SfoI</i>
<i>Phvul.003G212800</i>	26	<i>Acil, AclI, AsiSI, Aval, BceAI, BsaAI, BsaHI, BsiEI, BsrFI, BstUI, Faul, HaeII, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, KasI, NaeI, NarI, NgoMIV, PmlI, PvuI, Sall, SfoI</i>
<i>Phvul.004G122000</i>	16	<i>Acil, Aval, BsmBI, BstUI, Faul, HaeII, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, PaeR7I, SacII, TliI, XhoI</i>
<i>Phvul.005G126300</i>	5	<i>Acil, BmgBI, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.008G092800</i>	12	<i>Acil, AclI, Aval, BceAI, BsmBI, BspDI, BstUI, ClaI, Hgal, HpaII, HpyCH4IV, NruI</i>
<i>Phvul.009G065500</i>	16	<i>Acil, AclI, BceAI, BsaHI, BsrFI, BstUI, Faul, HaeII, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, NaeI, NgoMIV</i>
<i>Phvul.011G154300</i>	9	<i>Acil, BceAI, BmgBI, BspDI, ClaI, HhaI, HinP1I, HpaII, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.005G174800</i>	6	<i>Acil, BceAI, BstUI, HhaI, HinP1I, HpaII</i>
<i>Phvul.004G143000</i>	6	<i>Aval, BstBI, FspI, HhaI, HinP1I, HpaII</i>
<i>Phvul.002G187300</i>	12	<i>Acil, AclI, Aval, BsiEI, BsmBI, Faul, HpaII, HpyCH4IV, PaeR7I, Sall, TliI, XhoI</i>
<i>Phvul.007G211800</i>	18	<i>Acil, AclI, AgeI, Aval, BmgBI, BsaAI, BsmBI, BsrBI, BsrFI, BstUI, Faul, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, HpyCH4IV, PmlI, SmaI</i>
<i>Phvul.003G195700</i>	19	<i>Acil, AgeI, BceAI, BsaAI, BsiEI, BsmBI, BspDI, BsrBI, BsrFI, BstUI, ClaI, Faul, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, PvuI</i>
<i>Phvul.009G119900</i>	19	<i>Acil, BceAI, BmgBI, BsiEI, BsmBI, BsrBI, BsrFI, BstBI, BstUI, Faul, FseI, HaeII, HhaI, HinP1I, HpaII, HpyCH4IV, NaeI, NgoMIV, PvuI</i>
<i>Phvul.001G100200</i>	9	<i>Acil, AclI, Afel, BsaAI, HaeII, HhaI, HinP1I, HpaII, HpyCH4IV</i>
<i>Phvul.002G275000</i>	24	<i>Acil, Aval, BceAI, BmgBI, BsaAI, BsiEI, BspDI, BsrBI, BsrFI, BstUI, ClaI, EagI, Faul, Hgal, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, MluI, PaeR7I, PmlI, SmaI, SnaBI, TliI, XhoI</i>
<i>Phvul.009G070800</i>	19	<i>Acil, AclI, BceAI, BsaHI, BsmBI, BspEI, BsrBI, BstUI, Faul, HaeII, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, HpyCH4IV, KasI, MluI, NarI, SfoI</i>
<i>Phvul.001G026700</i>	12	<i>Acil, AclI, BsmBI, BstUI, Faul, Hgal, HhaI, HinP1I, HpaII, Hpy99I, HpyCH4IV, SacII</i>
<i>Phvul.006G220800</i>	10	<i>Acil, AclI, BceAI, BmgBI, BsrBI, BstBI, Faul, Hgal, HpaII, HpyCH4IV</i>

Continua ...

APÊNDICE D – Continuação

<i>Phvul.002G238800</i>	14	<i>Acil, Aval, BsiWI, BsrFI, BstBI, BstUI, Faul, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, HpyCH4IV, Nrul, SacII</i>
<i>Phvul.011G071400</i>	23	<i>AatII, Acil, Afel, Aval, BceAI, BsaAI, BsaHI, BsiWI, BsmBI, BsrBI, BsrFI, BstUI, Faul, Haell, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, Hpy99I, HpyCH4IV, MluI, PmlI, SnaBI</i>
<i>Phvul.004G176500</i>	27	<i>AatII, Acil, AclI, Afel, Agel, Aval, BceAI, BsaAI, BsaHI, BsiEI, BsiWI, BsrFI, BssHII, BstBI, BstUI, EagI, Faul, Haell, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, Hpy99I, HpyCH4IV, PmlI, SacII, Sall</i>
<i>Phvul.003G100600</i>	14	<i>Acil, Agel, Aval, BmgBI, BsaAI, BsaHI, BsrFI, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, HpyCH4IV, PmlI, SmaI</i>
<i>Phvul.011G040100</i>	24	<i>Acil, AclI, Afel, Aval, BceAI, BmgBI, BsaAI, BspDI, BssHII, BstBI, BstUI, Clal, Faul, Fspl, Haell, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, Hpy99I, HpyCH4IV, PaeR7I, TliI, Xhol</i>
<i>Phvul.003G016300</i>	15	<i>Acil, Aval, BceAI, BmgBI, BspDI, BssHII, BstUI, Clal, Faul, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, HpyCH4IV, Sma</i>
<i>Phvul.005G005800</i>	14	<i>Acil, Aval, BceAI, BmgBI, BsiEI, BspDI, BsrBI, Clal, HpalI, Hpy99I, HpyCH4IV, PaeR7I, TliI, Xhol</i>
<i>Phvul.001G214400</i>	17	<i>Acil, BsaAI, BsaHI, BsmBI, BspDI, BsrFI, BstUI, Clal, Hgal, Hhal, HinP1I, HpalI, Hpy99I, HpyCH4IV, MluI, Sall, SnaBI</i>

ANEXOS

ANEXO A – Quadro da determinação da curva padrão para análise do acúmulo de prolina, pela qual será obtida a equação de determinação de prolina livre no tecido vegetal. UTFPR, Câmpus Pato Branco - PR, 2016.

Tubo	[Prolina]	Prolina 100 µg.mL ⁻¹ (µL)	Ác. Sulfosa- licílico 3% (µL)	Ninhidrina ácida (µL)	Ác. acético glacial (µL)	Tolueno (µL)	Abs. 520 nm
1	0	0	500	1000	1000	2000	
2	5	25	475	1000	1000	2000	
3	10	50	450	1000	1000	2000	
4	15	75	425	1000	1000	2000	
5	20	100	400	1000	1000	2000	
6	25	125	375	1000	1000	2000	
7	30	150	350	1000	1000	2000	
8	35	175	325	1000	1000	2000	
9	40	200	300	1000	1000	2000	
10	45	225	275	1000	1000	2000	