

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES INDUZIDOS POR DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA

MARINHO, J.P.¹; KANAMORI, N.²; FERREIRA, L.C.³; CARVALHO, J.F.C.³; FREITAS, R.A.³; FUGANTI-PAGLIARINI, R.³; MARIN, S.R.R.³; RODRIGUES, F. A.³; MERTZ-HENNING, L.M.³; FARIAS, J.R.B.³; NEUMAIER, N.³; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.³; YOSHIDA, T.⁴; FUJITA, Y.²; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.⁴; NAKASHIMA, K.²; NEPOMUCENO, A.L.²; ¹Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina-PR, jumarinho39@hotmail.com; ²Japan International Research Center for Agricultural Sciences; ³Embrapa Soja; ⁴Laboratory of Plant Molecular Physiology

Os impactos das mudanças climáticas globais sobre a produção agrícola constituíram uma das prioridades de pesquisa científica na última década. O déficit hídrico é um dos principais fatores que afetam a produtividade das culturas, inclusive na soja. Neste contexto, a prospecção de genes que participam nos mecanismos de tolerância e defesa das plantas é essencial para desenvolver plantas tolerantes à seca por meio de modificação genética (Shanker et al., 2014).

O ácido abscísico (ABA) participa da coordenação das respostas à diminuição da disponibilidade de água e de outros estímulos ambientais em várias fases de desenvolvimento vegetal. Na via de sinalização ABA-dependente, o ABA se liga diretamente à família PYR/PYL de receptores ABA, resultando na inibição da classe de fosfatases 2C (PP2C) e ativação da sinalização ABA *downstream*. Desta forma, o ABA também regula a expressão de vários genes, cujos produtos podem funcionar na tolerância à desidratação. Alguns genes desta cascata estão relacionados à síntese de protetores osmóticos e proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), sob condições de estresse osmótico e atuam na tolerância ao déficit hídrico (Fujita et al., 2011).

Esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a expressão dos genes responsivos ao déficit hídrico *GmRAB18*, *GmPP2C* e *GmSnRK2* em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico.

Foram utilizadas plantas da cultivar BR 16 (sensível ao déficit hídrico) e uma linhagem transgênica transformada com *SAT5* (tolerante). Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso 2x2, sendo 2 linhagens e 2 condições hídricas (controle e déficit hídrico), com nove repetições. O déficit hídrico (DH) foi identificado com base em valores de condutância estomática (gs) inferiores a 200 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, enquanto a condição controle (C) correspondeu a valores de gs superiores a 200 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. A condição controle correspondeu à manutenção do substrato a 100% da capacidade de campo, enquanto o DH foi induzido por suspensão total da irrigação no estágio V₄.

Para se verificar o perfil de expressão dos genes foi realizada análise por reação de transcrição reversa, seguida de amplificação por RT-qPCR. Os genes selecionados para análise de expressão foram: fosfatase *GmPP2C*, quinase *GmSRK2*, e *GmRAB18*. As amostras de RNA total foram obtidas usando-se o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A purificação das amostras foi feita com o kit DNase I. Cerca de 5 µg dos RNAs totais foram utilizados para a síntese do cDNA utilizado-se o kit Superscript® III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies).

O desenho dos *primers* para o RT-qPCR foi realizado com o auxílio do programa Primer Express versão 3.0 (Applied Biosystems). Para cada gene e para cada tratamento, a quantificação relativa do nível de expressão gênica foi realizada em três amostras, cada qual representada por um bulk de três repetições biológicas (n=9).

As reações foram conduzidas em termociclador 7900 HT (Applied Biosystems) utilizando-se o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. Como gene referência foi utilizado a β -actina (acesso nº: GMU60500), o qual apresenta expressão constitutiva em todos os tecidos sob condições de déficit hídrico. A expressão relativa foi determinada pela normalização com o gene referência β -actina para as plantas controle (C) e submetidas ao déficit hídrico (DH). A expressão foi calculada pelo método $2^{-(Dc)}$, onde Dc = Ct experimental - Ct normalizador.

O gene *GmRAB18*, responsivo ao déficit hídrico, foi significativamente expresso (aproximadamente 20x) nas plantas BR 16 sob condições de déficit hídrico (Figura 1a). Na linhagem transgênica *SAT5*, embora a expressão tenha aumentado em condição de déficit, o aumento foi relativamente menor (cerca de 5x) em comparação com a cultivar não transformada. A importância do ABA endógeno para a expressão do *RAB18* tem sido também demonstrada em vários estudos (Bauer et al., 2013; Marcolino-Gomes et al., 2014; Li et al., 2014). De acordo com os resultados observados no presente estudo, a alta expressão deste transcrito em BR 16 está, possivelmente, associada ao déficit hídrico severo ao qual as plantas BR 16 foram submetidas, enquanto que a linhagem transgênica não alcançou tal estresse.

Com relação ao gene que codifica para a fosfatase *GmPP2C*, observa-se que na condição controle os níveis de expressão desse gene foram maiores na cv. BR 16; porém, quando submetido ao déficit hídrico, a linhagem transgênica apresentou aumento nos níveis desse transcrito, o que não ocorreu na cv. BR 16 (Figura 1b). Resultados diferentes foram observados para o perfil de expressão de *GmPP2C* no trabalho de Marcolino-Gomes et al. (2014), sendo que a cultivar cv. BR 16 apresentou alto nível de expressão sob déficit severo.

Já com relação a proteína quinase *GmSnRK2* em condição de estresse por déficit hídrico, ambos os genótipos apresentaram aumento na expressão do gene, porém com maiores níveis de expressão no genótipo tolerante (Figura 1c). Tais resultados corroboram com o fato de que tal proteína possui função essencial em resposta ao estresse osmótico. Ainda, evidências genéticas têm demonstrando que algumas quinases são importantes reguladores positivos na sinalização de ABA (Kobayashi et al., 2005; Fujii et al., 2011; Kulik et al., 2011).

Desta forma, em condição de estresse por déficit hídrico, observa-se que o gene *GmRAB18* foi fortemente induzido, porém em maior intensidade em materiais susceptíveis e para *GmSnRK2*, os genótipos apresentaram aumento na expressão do gene, porém os maiores níveis de expressão foram observados no genótipo tolerante *SAT5*. A expressão desses genes responsivos ao déficit hídrico pode contribuir para a ativação dos mecanismos de defesa vegetal e assim aumentar as chances de sobrevivência em períodos de seca.

REFERÊNCIAS

- BAUER, H.; ACHE, P.; LAUTNER, S.; FROMM, J.; HARTUNG, W.; AL-RASHEID, K.A.S.; SONNEWALD, S.; SONNEWALD, U.; KNEITZ, S.; LACHMANN, N.; MENDEL, R.R.; BITTNER, F.; HETHERINGTON, A.M.; HEDRICH, R. The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. *Current Biology*, v.23, p.53-57, 2013.
- FUJII, H.; VERSLUES, P.E.; ZHU, J.K. Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.108, p.1717-1722, 2011.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, v.124, p.509–525, 2011.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F.A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BENDIX, C.; NAKAYAMA, T.J.; CELAYA, B.; MOLINARI, H.B.C.; OLIVEIRA, M.C.N.; HARMON, F.G.; NEPOMUCENO, A.L. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS ONE*, v.9, (1):e86402, 2014.

KOBAYASHI, Y.; MURATA, M.; MINAMI, H.; YAMAMOTO, S.; KAGAYA, Y.; HOBO, T.; AKIKO, Y.; HATTORI, T. Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal*, v.44, p.939-949, 2005.

KULIK, A.; WAWER, I.; KRZYWINSKA, E.; BUCHOLC, M.; DOBROWOLSKA, G. SnRK2 protein kinases – key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v.12, p.859-872, 2011.

LI, C.; CHANG, P.P.; KIBREAB, M.G.; QIN, L.; LIANG, Y. Overexpression of tomato SpMPK3 gene in *Arabidopsis* enhances the osmotic tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.443, p.357-362, 2014.

SHANKER A.K., MAHESWARI M., YADAV S.K., DESAI S., BHANU D., ATTAL N.B., VENKATESWARLU B. Drought stress responses in crops. *Functional Integrative Genomics*, v.14, p.11-22, 2014.

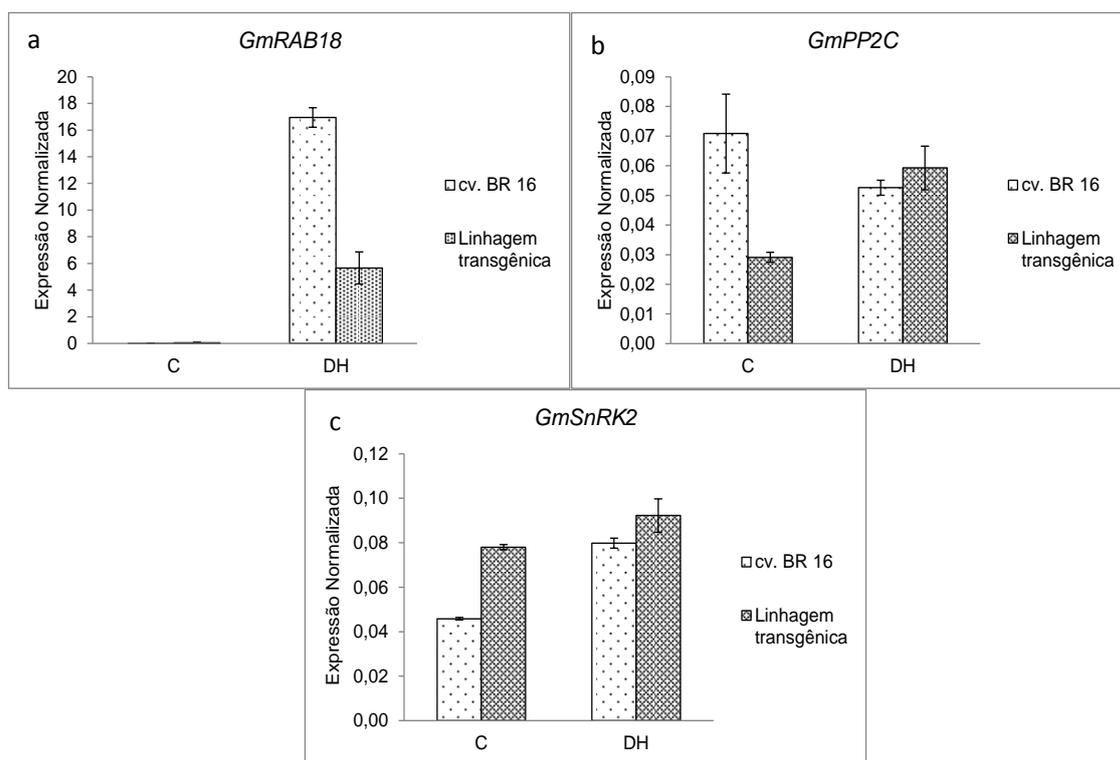


Figura 1 - Nível de expressão dos genes (a) *GmRab18*, (b) *GmPP2* e (c) *GmSnRK2* na cultivar BR 16 e na linhagem transgênica SAT5 em controle (C) e déficit hídrico (DH). A expressão foi normalizada com o gene de referência *Gmβ-actina*. Valores representam médias ± erro padrão; número de repetições = 9.