

USO DE DEHIDRINAS COMO MARCADORES DE EXPRESSÃO PARA SOJA SOB ESTRESSES ABIÓTICOS

RODRIGUES, F.A.^{1*}; FUGANTI-PAGLIARINI, R.^{1*}; ENGELS, C.²; MARIN, S.R.R.^{1,2}; FARIAS, J.R.B.¹; NEUMAIER, N.¹; NEPOMUCENO, A.L.¹. ¹Embrapa Soja, Londrina- PR; ²Universidade Estadual de Londrina. alexandre.nepomuceno@embrapa.br

As adversidades ambientais às quais a cultura da soja está sujeita têm sido um desafio para a expansão das fronteiras agrícolas das regiões com alto potencial de produtividade. Fatores abióticos, como o déficit hídrico e as altas temperaturas, podem comprometer significativamente o crescimento e desenvolvimento da cultura, limitando sua produtividade final. De acordo com MANAVALAN et al., (2009) quando cultivares com algum nível de tolerância a seca são analisadas, características importantes como morfologia e plasticidade de raízes, condutância estomática, condutância da epiderme, densidade da pubescência foliar, eficiente uso da água e ajuste osmótico da parte aérea devem ser consideradas. PASSIOURA (2012) afirma que uma das aplicações da informação fenotípica no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca é o desenvolvimento de ferramentas de seleção, preferencialmente marcadores moleculares robustos, que sejam facilmente quantificados nas características morfológicas, de desenvolvimento e fisiológicas.

Estudos para a investigação de potenciais marcadores moleculares de déficit hídrico e alta temperatura já foram realizados em culturas como milho (BADICEAN et al., 2011), grão de bico (VARSHNEY et al., 2009), trigo (AL-DOSS et al., 2011) e arroz (YE et al., 2012). Assim, visando obter ferramentas moleculares que possibilitem a identificação de cultivares de soja com características de tolerância aos estresses, a expressão de genes codificadores das desidrinas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130) e LEA18 (Glyma17g17860) foi avaliada no tecido foliar, caulinar e radicular das cultivares Embrapa 48 (tolerante) e BR 16 (sensível), sob condições de déficit hídrico e alta temperatura, para determinar o potencial uso como marcadores de expressão.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob 12 h de luz (50 ± 10 μmol fótons/ m^2/s) a 28°C, e 12 h de escuro a 25°C, até o estágio de desenvolvimento V₄. As plantas foram então separadas em três grupos de 36 plantas (cada grupo contendo o respectivo controle): I- déficit hídrico (DH); II- alta temperatura (AT); III- déficit hídrico + alta temperatura (DH + AT). O desenho experimental foi inteiramente casualizado e composto por 3 repetições biológicas. O DH foi aplicado pela suspensão da irrigação por 2, 4 e 6 dias (umidade gravimétrica de 83%). O tratamento AT foi aplicado pela transferência das plantas para câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 h luz (28°C)/12 h escuro (25°C). Após 12 h de aclimação, as plantas controle foram mantidas a 25°C e as plantas submetidas ao estresse foram mantidas a 42°C por 2, 6 e 12 h. Para o tratamento combinado DH + AT, as plantas submetidas a 2 dias sob DH foram transferidas para câmara de crescimento a 42°C e mantidas nessas condições por 2, 6 e 9 h.

A taxa fotossintética (A) e condutância estomatal (Gs) foram medidas durante o tratamento experimental utilizando o LiCor 6400. As medidas foram executadas no folíolo do meio da folha mais jovem totalmente expandida. Pela razão entre A e T (Transpiração) foi determinado a Eficiência do Uso de Água (EUA) intrínseco. A análise estatística foi realizada com o programa SISVAR 5.3 utilizando o teste de Tukey a 5% de significância.

O RNA total foi extraído usando o reagente RNAiso (Invitrogen®) e qualidade foi analisada em Bioanalyzer (Agilent). Os *primers* dos genes alvo e do gene referência *GmrRNA18S* (X02623.1) foram desenhados com o *Primer3*. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador 7300 *Real Time System* (Applied Biosystem) usando Syber Takara® Fluorescence Chemical (Takara®). Reações individuais foram realizadas em triplicatas para cada gene alvo, gene referência e amostras de controle negativo. As amplificações começaram com o ciclo inicial de denaturação (95°C por 10 s) seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 s, anelamento de 60°C por 35 s. A etapa de dissociação (95°C for 15 s; 60° for 1 min; 95°C for 15 s; 60°C for 15 s) também foi realizada. A análise dos dados foi realizada de acordo com LIVAK & SCHMITTGEN (2001), na qual os valores de Ct do gene referência e plantas controle (calibrador) foram empregados como endógenos para normalizar a expressão relativa dos genes alvos.

Nas plantas sob DH ocorreu uma significativa diminuição de A e Gs, assim como o aumento da EUA, enquanto que na situação controle a cultivar Embrapa 48, na maioria das vezes, apresentou maiores valores de trocas gasosas que a cultivar BR 16. Com base nos valores de condutância estomática (Figura 1), foi possível verificar que no segundo dia de DH as plantas de ambas as cultivares se encontravam em situação de disponibilidade de água ainda considerada normal ($gs > 0,2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); o terceiro dia foi considerada condição de déficit moderado ($gs = 0,1 \text{ to } 0,2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); e no quarto e quinto dias foram consideradas em estresse severo ($gs < 0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (FLEXAS et al. 2004).

Os principais resultados mostraram que a expressão de LEA18 foi 33 x maior na cultivar Embrapa 48 após 2 dias sob DH, a qual aumentou com o tempo de exposição (6 dias, 156 x). Considerando o efeito combinado do estresse, o gene Mat9 foi consideravelmente mais expresso (33.643 x) na cultivar tolerante em 2d e 6h sob DH + AT. Na mesma condição, o gene ERD14 apresentou padrão, porém com uma razão de expressão menor (11 x) (Figura 2).

No tecido caulinar o gene Mat9 foi altamente expresso sob DH (razão de 300.000 x), entretanto não houve diferença significativa entre as cultivares. Para o tratamento AT + DH, o melhor marcador de expressão foi o gene ERD14 que apresentou maior expressão na cultivar tolerante aos 2d e 2h sob estresse.

A expressão do gene ERD14 (3,51 x na BR 16 e 22,62 x na Embrapa 48) e LEA18 (40 x na BR 16 e 630 x na Embrapa 48) no tecido radicular foi significativa após seis dias sob DH. Porém, na situação DH + AT a expressão do gene LEA18 em resposta ao estresse combinado foi mais pronunciada no período 2d e 6h.

O perfil de expressão dos genes candidatos indicou o tecido foliar como o mais apropriado para avaliar o efeito do(s) estresse(s) abiótico(s) nas plantas de soja, uma vez que este apresenta fácil amostragem e permite diferenciar as cultivares nos períodos iniciais do estresse (Figura 2). O perfil de expressão indica que todos os 3 genes possuem potencial para uso como marcador molecular de expressão sob condições de déficit hídrico, pois são detectados em períodos iniciais do estresse (2 dias) e apresentaram uma razão de expressão nas plantas tolerantes (Embrapa 48) significativamente contrastante da cultivar sensível (BR 16). As desidrinas Mat9 e ERD14 também apresentaram expressão significativa na condição de estresse combinado, permitindo a diferenciação dos cultivares. Com base no alto valor de expressão observado para Mat9 sob DH + AT (Figura 2B), este gene pode ser indicado como marcador potencial para soja sob condições de déficit hídrico e alta temperatura.

Referências

AL-DOSS AA, ELSHAFEI AA, MOUSTAFA KA, SALEH M, BARAKAT MN (2011) Comparative analysis of diversity based on morpho-agronomic traits and molecular

markers in durum wheat under heat stress. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.3671-3681.

BADICEAN D, SCHOLTEN S, JACOTA A (2011) Transcriptional profiling of *Zea mays* genotypes with different drought tolerances – new perspectives for gene expression markers selection. **Maydica**, v.56, p.1724.

FLEXAS J, BOTA J, LORETO F, CORNIC G, SHARKEY TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v.6, p.269-279.

LIVAK KJ AND SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Methods**, v.25, p. 402-408.

MANAVALAN LP, GUTTIKONDA SK, TRAN L-S P, NGUYEN HT (2009) Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. **Plant & Cell Physiology**, v.50, n.7, p.1260-1276.

PASSIOURA JB (2012) Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? **Functional Plant Biology**, v. 39, p. 851–859.

VARSHNEY RK, HIREMATH PJ, LEKHA P. et al (2009) A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **BMC Genomics**, v.10, p.523.

YE C, ARGAYOSO MA, REDOÑA ED et al (2012) Mapping QTL for heat tolerance at flowering stage in rice using SNP markers. **Plant Breeding**, v.131, p. 33-41.

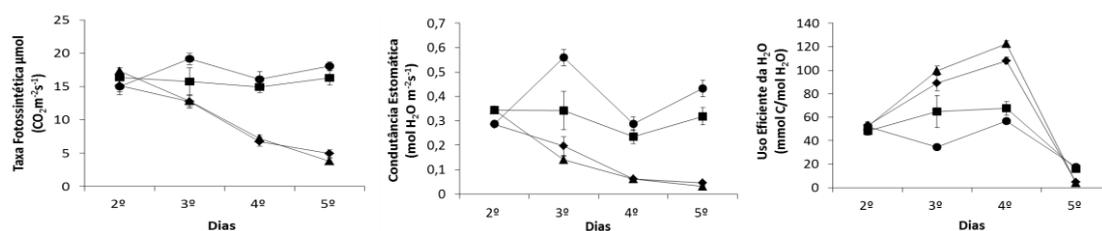


Figura 1: Trocas gasosas medidas durante o déficit hídrico (cinco dias consecutivos). (■) BR 16 controle; (◆) BR 16 DH; (●) Embrapa 48 controle e (▲) Embrapa 48 DH. Os dados foram avaliados pelo teste de Tukey a 5% de significância (n = 3 ± erro padrão da média).

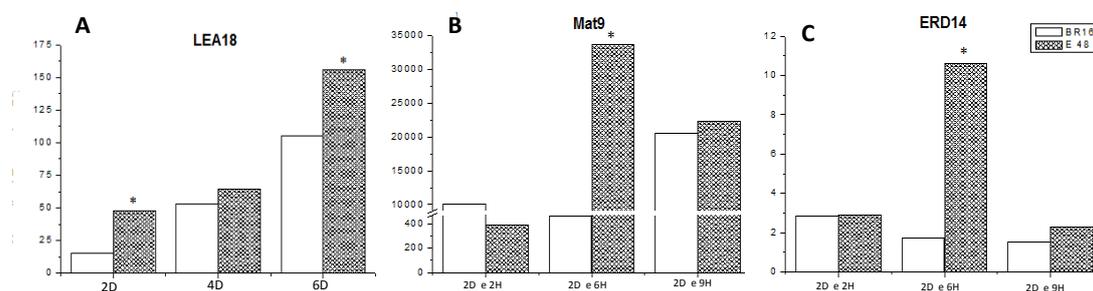


Figura 2: Análise de expressão gênica no tecido foliar de plantas de soja sob (A) DH, (B) DH + AT e (C) DH + AT. As barras representam a expressão relativa dos genes codificadores para as desidrinas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860) e o * indica as condições em que houve diferença estatística de acordo com o teste estatístico Tukey a 5% de significância.