

Identificação e avaliação da expressão de genes pertencentes a família CCCH *zinc finger* em duas cultivares de soja sob deficit hídrico

CARANHATO, A.L.H.¹; GIORDANI, W.²; MARINHO, J. P.³; REIS, R.R.³; ALEKCEVETCH, J.C.³; MARIN, S.R.³; MARCOLINO-GOMES, J.⁴; NEPOMUCENO, A.L.⁵; MERTZ-HENNING, L.M.⁵

¹UTFPR-DV, bolsista Embrapa Soja, andrelhcaranhato@gmail.com; ²UEL, Mestrando/CNPq; ³Doutorando/CAPES, Embrapa Soja; ⁴Pós Doutorando/CAPES, Embrapa Soja; ⁵Pesquisador(a), Embrapa Soja.

Introdução

A soja (*Glycine max*) é uma das principais espécies cultivadas no mundo. Na safra 2014/2015 a produção mundial desta oleaginosa chegou a 319 milhões de toneladas (CONAB, 2015). No Brasil, sua produção chegou a 96 milhões de toneladas (CONAB, 2016), colocando o país como segundo maior produtor mundial. Não só no Brasil, mas no mundo todo, diversos fatores bióticos e abióticos limitam a produção, dentre eles, o déficit hídrico pode ser destacado como um dos principais fatores limitantes, sendo que, no Brasil, 71% dos casos de perdas de produção, estão relacionados ao déficit hídrico (ARAUS et al., 2002; CASAGRANDE et al., 2001). Dessa forma, uma das estratégias para mitigação dos efeitos do déficit hídrico é o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes, as quais apresentem melhor estabilidade no rendimento em condição de estresse.

A resposta ao déficit hídrico pela planta é realizada por diversos mecanismos fisiológicos e moleculares, incluindo a ativação da expressão de um grande número de genes. A compreensão desses mecanismos torna-se uma ferramenta importante para a definição de estratégias biotecnológicas que contribuam para o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes ao estresse por déficit hídrico. De forma geral, a expressão destes genes está relacionada a presença de fatores de transcrição, que atuam na regulação de inúmeros processos celulares (WANG et al., 2008).

Os *Zinc Fingers* (Dedos de Zinco) são uma grande família de fatores de transcrição, classificados em diversos grupos que incluem C₂H₂, C₂HC, C₂C₂, C₂HCC₂C₂, C₂C₂C₂C₂ e CCCH. A classificação é baseada no número e na ordem de cisteínas e histidinas ligadas a um íon de zinco na estrutura secundária do *finger* (SEOK et al., 2016). Em *Arabidopsis thaliana* as proteínas *zinc finger* (AtTZFs) são potentes reguladores de respostas a estresses bióticos e abióticos. Em seu genoma, já foram identificados 68 genes que foram classificados e divididos em 11 subfamílias de acordo com o número de *zinc fingers* e do espaçamento entre as cisteínas e a histidina (WANG et al., 2008). Diversos trabalhos já demonstraram a relação dos *zinc finger*, com mecanismos de tolerância ao estresse. (WANG et al., 2008; PENG et al., 2012; SEOK et al., 2016).

As proteínas CCCH são compostas por três cisteínas seguidas por uma histidina, encontradas em organismos simples como as bactérias, a até organismos superiores como os eucariotos. Wang et al. (2008) identificaram 68 destes genes em *Arabidopsis* e 67 genes em arroz, os quais foram divididos em 20 subfamílias, a partir da sua filogenia e estrutura.

Em soja, a distribuição e caracterização detalhada dessas proteínas ainda não foram realizadas. Tendo em vista a importância desses genes nos mecanismos de resposta de plantas a estresses bióticos e abióticos, o objetivo do presente trabalho foi identificar e avaliar a expressão de genes pertencentes à família CCCH em duas cultivares de soja sob condições de déficit hídrico.

Material e Métodos

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com três repetições (constituídas por *bulks* de 10 plantas) em fatorial 2x7, sendo duas cultivares consideradas contrastantes para tolerância ao déficit hídrico: Embrapa 48 (tolerante) e BR 16 (susceptível) e sete tempos de exposição ao déficit hídrico (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 minutos). O experimento foi conduzido em hidroponia, sendo o estresse por déficit hídrico aplicado através da remoção das plantas da solução hidropônica e manutenção das mesmas em bandejas, sem água, em ambiente de casa-de-vegetação. A obtenção de plantas, aplicação do estresse, a coleta e o armazenamento das amostras, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rodrigues et al., 2012.

O RNA total foi extraído de raízes e das folhas de cada repetição utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A partir do RNA total extraído foram formados *bulks* resultando em amostras classificadas como: controle (tempo 0), nível de estresse 1 (25 e 50 minutos), nível de estresse 2 (75 e 100 minutos) e nível de estresse 3 (125 e 150 minutos). Posteriormente a avaliação da qualidade do RNA extraído, realizou-se o sequenciamento das amostras (RNAseq) através da plataforma Illumina, conforme a metodologia descrita por Rodrigues, et al., 2015. Foram geradas bibliotecas de tecidos de folhas e raízes, das cultivares Embrapa 48 e BR 16, sob condição controle e sob diferentes níveis de déficit hídrico. Os dados resultantes do sequenciamento foram carregados na plataforma *Genesifter™ analysis* (VizX Labs LLC, Seattle, WA, USA; <http://www.genesifter.net>)

Para a identificação e obtenção das sequências dos genes pertencentes à família CCCH foi realizada uma análise *in silico* na plataforma online Soybean Knowledge Base (*SoyKB*), onde por meio da ferramenta de busca *Browse/Gene families*, foram encontrados todos os genes já identificados em soja, pertencentes a essa família. Posteriormente, os genes selecionados foram comparados com dados de expressão da biblioteca de RNAseq gerada. As expressões dos genes identificados por meio desta busca, foram analisados nos resultados gerados pela

RNAseq na plataforma *Genesifter*TM, na qual os dados foram normalizados pelo total de *reads* mapeados.

Resultados e Discussão

Na análise *in silico* foram encontrados 147 genes da família CCCH. Dentre os 147 genes, 139 foram identificados na biblioteca de RNAseq de folhas e raízes de cada cultivar.

Na biblioteca de RNAseq das folhas da cultivar BR 16, 71 genes foram *up*-regulados e 103 foram *down*-regulados em pelo menos um dos níveis de estresse comparados ao controle. Em raízes os números observados foram de 64 genes *up*-regulados e 95 *down*-regulados. Para a cultivar Embrapa 48 foram encontrados 76 genes *up*-regulados e 83 *down*-regulados, em folhas e 49 genes *up*-regulados e 95 *down*-regulados em raízes.

A análise de expressão na plataforma *Genesifter*TM, indica os genes que foram *up*-regulados (coloração vermelha) e os genes que foram *down*-regulados (coloração verde) conforme é possível observar na Figura. 1.

O gene Glyma12g33320 foi *up*-regulado em todos os níveis de estresse, nas raízes e nas folhas de ambas as cultivares. Já o Glyma08g43270 apresentou *down*-regulação nas folhas (Figura A) e nas raízes (Figura C) da cultivar BR 16, porém, na Embrapa 48 este gene foi *up*-regulado nas folhas (Figura B) e nas raízes (Figura D).

Devido à expressão do Glyma12g33320 apresentar *up*-regulação em todos os níveis de estresse nas duas cultivares, é possível indicar que este gene, é um gene-resposta ao estresse por déficit hídrico, tendo em vista que apresentou elevada expressão mesmo na cultivar sensível. Por outro lado, o gene identificado como Glyma08g43270 foi *up*-regulado apenas na cultivar Embrapa 48 e *down*-regulado na cultivar BR 16, sendo um potencial candidato a conferir tolerância ao déficit hídrico, uma vez que se diferenciou apenas no material tolerante. Esse comportamento foi observado tanto em tecidos de folha, bem como de raiz.

Esta diferença de expressão entre genes da família CCCH *zinc finger*, também foi encontrada por Wang et al., (2008), onde foi verificada a expressão de 11 genes de arábida, submetidas ao estresse por déficit hídrico e estes apresentaram relação com a resposta a estresses abióticos.

Conclusão

A família CCCH *zinc finger* apresentou inúmeros genes em soja, com expressão alterada em resposta ao déficit hídrico.

Baseado no padrão de expressão desses genes, o Glyma08g43270 foi selecionado como candidato a conferir tolerância ao déficit hídrico, enquanto que o Glyma12g33320 atua nos mecanismos de resposta ao estresse.

Referências

ARAUS, J. L.; SLAFER, G. A; REYNOLDS, M. P; & ROYO, C. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 925-940, 2002.

CASAGRANDE, E.C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M.C.; & NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 168-184, 2001.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Volume 3 – Safra 2015/2016. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_11_15_20_36_boletim_graos_marco_2016.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2016.

CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**. Volume 3 - Safra 2015/2016, produtos de verão. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_24_11_44_50_perspectivas_agropecuaria_2015-16_-_produtos_verao.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2016.

PENG, X.; ZHAO, Y.; CAO, J.; ZHANG, W.; JIANG, H.; LI, X.; MA, Q.; ZHU, S.; CHENG, B. CCCH-type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments. **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. e40120, 2012.

RODRIGUES, F.A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARCOLINO-GOMES, J.; NAKAYAMA, T. J.; MOLINARI, H. B. C.; LOBO, F. P.; HARMON F. G.; NEPOMUCENO, A. L. Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

RODRIGUES, F.A.; MARCOLINO-GOMES, J.; CARVALHO, J. F. C.; NASCIMENTO, L. C.; NEUAMIER N.; FARIAS, J. R. B.; CARAZZOLLE, M. F.; MARCELINO, F. C.; NEPOMUCENO, A. L.; Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 304-314, 2012.

SEOK, H.Y.; WOO, D. H.; PARK, H. Y.; LEE, S.Y.; TRAN, H. T.; LEE, E. H.; NGUYEN, L. V.; MOON, Y. H.; AtC3H17, a non-tandem CCCH zinc finger protein, functions as a nuclear transcriptional activator and has pleiotropic effects on vegetative development, flowering and seed development in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 3, p. 603-615, 2016.

WANG, D.; GUO, Y.; WU, C.; YANG, G.; LI, Y.; & ZHENG, C.; Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1, 2008.

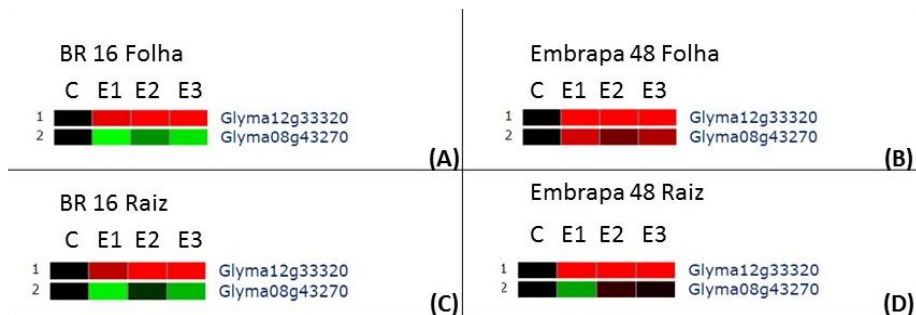


Figura 1. Expressão dos genes Glyma12g33320 e Glyma08g43270 nas folhas e nas raízes de duas cultivares de Soja, representadas pelas colorações: preto (sem alteração), verde (down-regulado) e vermelha (up-regulado). Submetidas a quatro níveis de déficit hídrico: Controle, 0 minutos (C), Estresse de 25-50 minutos (E1) Estresse de 75-100 (E2), Estresse de 100-125 minutos (E3). Determinados nas folhas das cultivares BR 16(A) e Embrapa 48 (B) e nas raízes das cultivares BR 16 (C) e Embrapa 48 (D).