

DOCUMENTOS

440

ISSN 2176-2937
Agosto/2021

XVI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

Resumos expandidos



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

DOCUMENTOS 440

XVI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja Resumos expandidos

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite
Kelly Catharin*
Editoras Técnicas

***Embrapa Soja
Londrina, PR
2021***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rod. Carlos João Strass, s/n
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta
CEP 86001-970
Caixa Postal 231
Londrina, PR
Fone: (43) 3371 6000
www.embrapa.br/soja
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Soja**

Presidente
Alvadi Antonio Balbinot Junior

Secretária-Executiva
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros
Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Claudine Dinali Santos Seixas, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Liliane Márcia Mertz-Henning, Marco Antônio Nogueira, Mariangela Hungria da Cunha, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier

Supervisão editorial
Vanessa Fuzinato Dall' Agnol

Normalização bibliográfica
Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Edição eletrônica e capa
Vanessa Fuzinato Dall' Agnol

1ª edição
PDF digitalizado (2021).

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (16. : 2021: Londrina, PR).

Resumos expandidos [da] XVI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina Maria Villas Boas de Campos Leite, Kelly Catharin, editoras técnicas – Londrina: Embrapa Soja, 2021.

163 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 440).

1. Soja-Pesquisa. 2. Pesquisa agrícola. I. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

Análise *in silico* da família PF00257 em soja visando identificar genes candidatos para tolerância à seca via edição gênica

SOUZA, E. M. G.¹; MARIN, D. R.¹; MOLINARI, M. D. C.²; MARIN, S. R. R.³; MERTZ-HENNING, L. M.⁴; NEPOMUCENO, A. L.⁴

¹Unifil, Centro Universitário Filadelfia, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, enya.souza07@gmail.com; ²Pós-doutoranda, Embrapa Soja; ³Analista, Embrapa Soja; ⁴Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A soja é uma cultura de grande importância mundial. É utilizada em vários setores da agroindústria, desde a fabricação de ração animal até a produção de combustíveis renováveis (Aprosoja, c2018). A cadeia produtiva da soja movimentava bilhões de dólares no Agronegócio impactando fortemente no PIB mundial (Franceschini et al., 2017). Contudo, a soja é uma cultura fortemente afetada por fatores bióticos e abióticos como a seca que pode gerar perdas significativas na lavoura. Entre os anos 1976/77 e 2013/14 o Brasil deixou de ganhar US\$ 79,62 bilhões devido a perdas de produção ocasionadas especialmente pela seca (Ferreira, 2016). Cabe ressaltar que cenários climatológicos futuros preveem o aumento de episódios de seca (IPCC, c2011). Diante deste quadro, é importante que sejam desenvolvidas estratégias biotecnológicas que permitam mitigar as perdas causadas pela seca, entre elas o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a esta condição ambiental adversa. Quando a soja é submetida a seca, inicia-se uma cascata gênica regulatória que desencadeia respostas a nível fisiológico e bioquímico, por meio da ativação ou inativação de genes após a percepção do estresse pela planta (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007). As vias moleculares mais conhecidas de resposta à seca são divididas em dependentes do ácido abscísico (ABA) e independentes de ABA (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Em ambas as rotas inúmeros genes atuam em resposta ao déficit hídrico e entre eles estão genes da família PF00257 (Desidrina), que atuam como osmoprotetores (Yamasaki et al., 2013).

Diante deste quadro, esse trabalho tem como objetivo a análise *in silico* dos genes pertencentes à família PF0027 em soja, visando identificar genes candidatos a melhorar a tolerância à seca em soja via edição gênica.

Materiais e Métodos

A partir de análises transcritômicas de soja tolerante (E48) e sensível (BR16) ao déficit hídrico, foi selecionado o gene Glyma.09G185500 (Desidrina) que apresentou altas expressões em ambas as cultivares em folhas e raízes sob déficit hídrico. As expressões foram resgatadas a partir dos dados brutos depositados no banco de dados NCBI (bioprojeto PRJNA615913). As expressões em transcritos por milhão (TPM) em todos os tecidos de soja sob condição controle (irrigada) foram obtidas a partir do banco de dados transcritômicos de soja¹.

A identificação dos membros pertencentes à família gênica ao qual o Glyma.09G185500 faz parte, foi realizada a partir do arquivo de anotação do genoma da soja versão Wm82.a2.v1 e W82.a4.v1². Somente os genes presentes nas duas versões foram selecionados, a fim de eliminar possíveis erros de anotação.

Para identificação de ortólogos em espécie modelo para dicotiledôneas, *Arabidopsis thaliana* e identificação de cópias e parálogos em soja foi realizado um BlastP através do *genome browser* Persephone³. A identificação de peptídeo de transferência subcelular foi obtida a partir do software TargetP⁴, com objetivo de verificar o local de ação dos genes. O alinhamento de sequências proteicas para desenho do dendograma foi realizada através do software Muscle⁵ e ItoI⁶ e logo do motivo ABRE e segmento K, foi obtido a

¹ http://venanciogroup.uenf.br/cgi-bin/gmax_atlas/index.cgi

² <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

³ <https://web.persephonesoft.com/>

⁴ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

⁵ <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

⁶ <https://itol.embl.de/tree>

partir do software Weblogo⁷. A identificação de domínios ativos foi realizada no software MotifScan⁸.

A análise de região promotora foi feita a partir do software RSATplant⁹, a partir do qual foram contabilizados os números de motivos ABRE (ACGT), responsivos ao ácido abscísico-ABA, entre as regiões -1 a -2000pb do sítio de início da transcrição-TSS (Maruyama et al., 2012).

Resultados e Discussão

Foi observado, a partir dos dados de expressão de folhas e raízes de soja sob seca (bioprojeto PRJNA615913), que o Glyma.09G185500 apresentou aumento nos níveis de expressão *in silico* tanto em folhas quanto em raízes das duas cultivares de soja avaliadas (sensível e tolerante). Em folhas, a expressão foi 12X superior sob seca para ambas as cultivares, enquanto em raízes a expressão foi 6X superior quando comparado a condição controle (irrigada) (Figura 1A).

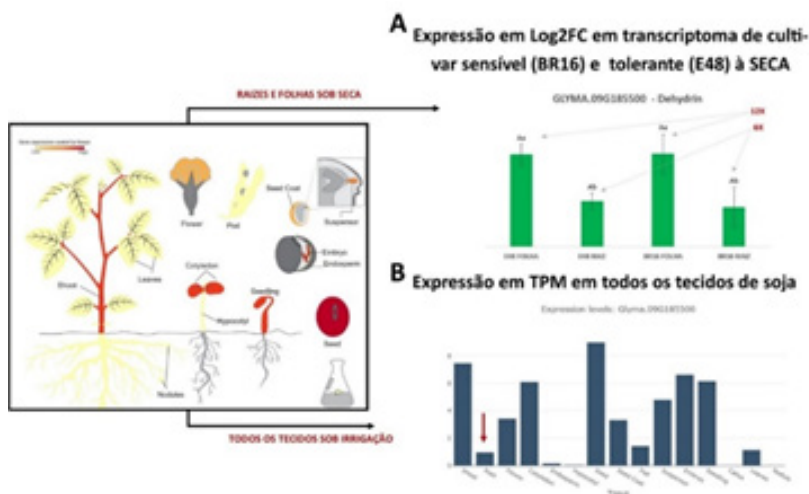


Figura 1. Expressão em transcritos por milhão (TPM) e log2FC do Glyma.09G18550, em transcriptoma de folhas e raízes de soja sob seca (A) e em todos os tecidos de soja, condição controle (B).

⁷ <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>

⁸ https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan

⁹ <http://rsat.sb-roscoff.fr/>

Estes dados sugerem um papel importante do gene à nível de espécie pois foi up-regulado igualmente tanto na cultivar sensível quanto na tolerante. O Glyma.09G185500 pertence à família gênica PF00257 composta por genes codificadores de desidrinas. Um total de 9 genes pertencentes a família PF00257 foram identificadas em soja (Glyma.04G009900; Glyma.08G048900; Glyma.16G038000; Glyma.07G090400; Glyma.17G187600; Glyma.12G235800; Glyma.04G009400; Glyma.09G185500; Glyma.13G201300) (Figura 2A). As desidrinas atuam na proteção de membranas lipídicas celulares conferindo atividade protetora. Em arroz foi observado que a superexpressão da desidrina 1 (DHN1) aumentou a tolerância à seca e eliminou espécies reativas de oxigênio (Kumar et al., 2014). A superexpressão da desidrina 5 (DHN5) de milho em *Arabidopsis* também aumentou a tolerância à seca através do ajuste osmótico, além disso mostrou-se responsiva ao ABA (Brini et al., 2007). Em tomate a superexpressão da desidrina ShDhN aumentou a tolerância à seca através do acúmulo de antioxidantes (Liu et al., 2015).

Em *Arabidopsis thaliana*, o gene de desidrina DHNA e DHNC de musgo *Physcomitrella patens*, aumentou a tolerância à seca, além de melhorar a estabilidade de membranas, enzimas e nucleotídeos (Li et al., 2017). Nesse mesmo estudo, foi observado que as plantas transgênicas apresentaram maior capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio-ROS. Em tabaco, a superexpressão de desidrina de *Prunus mume* PmDHN também aumentou a tolerância à seca (Bao et al., 2017). Em soja, dados de proteoma mostram que variedades mais tolerantes a seca apresentam maiores níveis de desidrinas comparadas a cultivares sensíveis (Arumingtyas; Savitri, 2013).

Após observar que o gene de desidrina apresenta papel responsivo a seca, foi verificado se de fato, o Glyma.09G185500 era o membro da família mais importante em folhas e raízes de soja. A Figura 1 demonstra que embora a expressão tenha aumentado em folhas e raízes de soja (Figura 1A), o Glyma.09G185500 apresenta maior expressão em sementes, caule, cotilédone e plântulas em desenvolvimento (Figura 1B). Diante deste resultado, a expressão de todos os membros da família PF00257 foi obtida com objetivo de identificar qual dos genes desempenham papel mais expressivo em folhas e raízes de soja (Figura 2B). Foram encontrados um total de 9 genes pertencentes a família PF00257 em soja (Tabela 1). Em *Arabidopsis thaliana*

Os nove genes pertencentes à família PF00257 estão distribuídos em 8 cromossomos (4; 7; 8; 9; 12; 13; 16; 17). Todos em cópia única, sendo 6 (Glyma.17G187600; Glyma.13G201300; Glyma.12G235800; Glyma.09G185500; Glyma.07G090400; Glyma.04G009400) ABA responsivos e 3 não (Glyma.16G038000; Glyma.08G048900; Glyma.04G009900) (Tabela 1). Segundo Maruyama et al. (2012) somente genes que apresentam dois ou mais motivos ABRE em seus promotores são responsivos ao ABA. Pois para que a resposta induzida por ABA seja efetiva no mínimo dois elementos são requeridos para anelamento a sequência proteica, seja pelo ABA ou fatores de transcrição como AREB (Maruyama et al., 2012).

Ao comparar as sequências proteicas dos nove membros da família PF00257 com seus respectivos ortólogos, foi possível observar a formação de 3 clusters (Figura 2A). Cada cluster evidencia a similaridade dos genes de soja com seus respectivos ortólogos e parálogos mais próximos. Ao avaliar a expressão em TPM de 99 bioensaios provenientes de 33 bioprojetos de raízes, as desidrinas codificadas pelos genes Glyma.17G187600 e Glyma.04G009400 se mostraram mais expressas (Figura 2B) comparadas ao restante dos genes da família. Em folhas, a partir da análise de 601 bioensaios provenientes de 41 bioprojetos, os mesmos genes se destacaram. O gene Glyma.09G185500 observado nas bibliotecas de RNA-Seq de cultivares contrastantes em resposta a seca, também apresentou contagens significativas em ambos os tecidos, porém inferior aos Glyma.17G187600 e Glyma.04G009400 (Figura 2B).

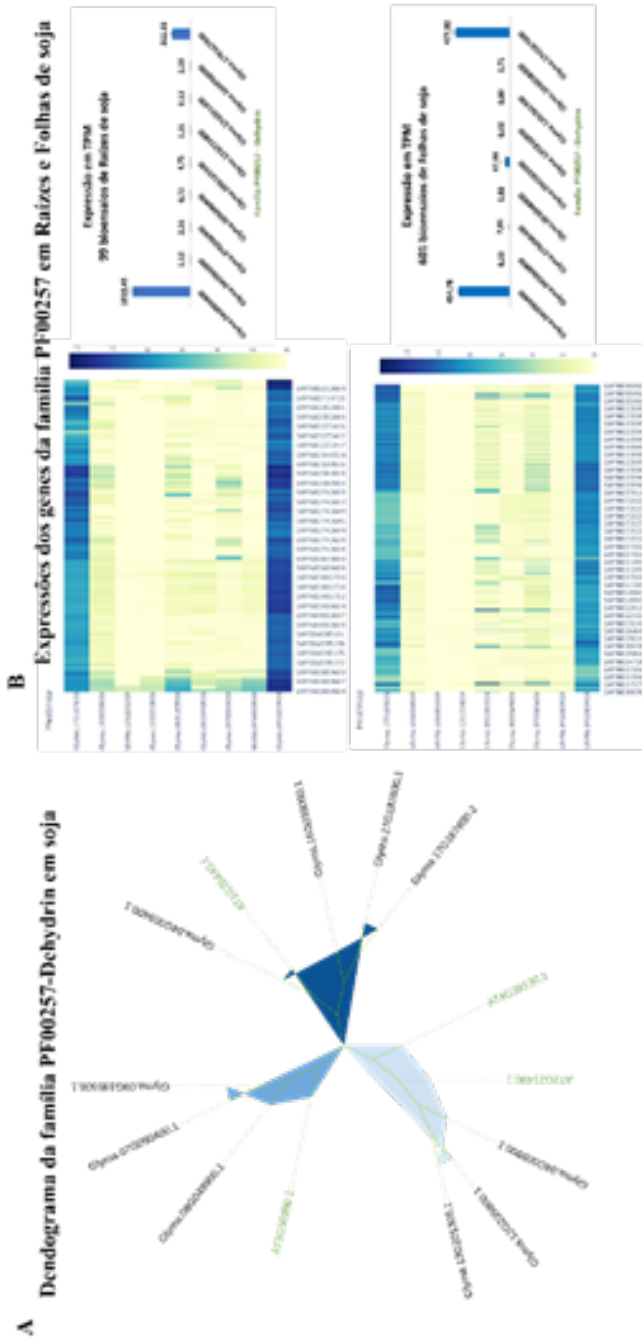


Figura 2. Análise de similaridade proteica entre os 9 membros da família PF00257 em soja. A. Dendrograma formando 3 clados, representados em tons diferentes de azul. Em verde estão os 4 ortólogos em *Arabidopsis* e em preto os 9 genes de soja. B. Expressões de todos os membros da família em soja. Os *heatmap*s representam as expressões em 99 bioensaios de raiz e 691 bioensaios de folha. O gráfico de barra representa média das expressões entre os bioensaios. A barra representa o erro padrão entre as amostras.

Para identificar o local de ação dos genes foi realizada a busca por peptídeo sinal de transferência subcelular nas sequências de proteínas de todos os genes. Nenhum dos genes avaliados apresentaram peptídeo sinal para transporte, indicando sua atividade no citoplasma da célula da planta (Figura 3).

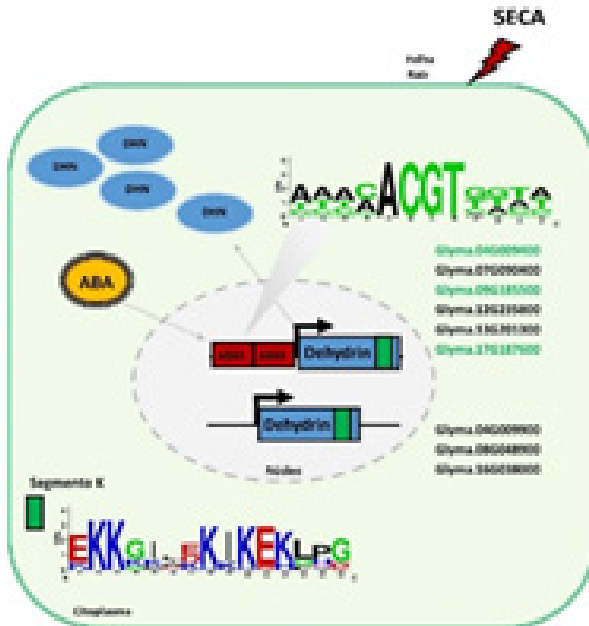


Figura 3. Esquema da atuação do ácido abscísico-ABA nos membros da família PF00257. O weblogo representa o domínio conservado ABRE, responsivo ao ABA (Saruhan-Güler; Terzi, 2020, adaptado). Em verde estão representados os genes da família mais expressos em folhas e raízes de soja.

O alinhamento proteico mostrou a presença de um domínio altamente conservados entre soja e *Arabidopsis* na região 290 a 305 das proteínas avaliadas (Figura 3). Esse domínio é um seguimento rico em lisina denominado K. Segundo Malik et al. (2017), as famílias de proteínas de desidrina contêm três domínios conservados, denominados segmentos K, Y e S. Entre os segmentos conservados, um resíduo rico em lisina denominado K é prevalente em todas as desidrinas. Nas angiospermas, a sequência comum do segmento K é EKKGIMDKIKEKLPG. O segmento K geralmente está localizado próximo ao C-terminal e participa da formação de uma classe de α -hélice anfipática A2 (Hughes; Graether, 2011). Esse segmento pode interagir com membranas ou proteínas para modular suas propriedades (Hughes; Graether, 2011). Em um estudo de superexpressão da desidrina 13 de milho foi observado que o seguimento K presente nesta proteína foi fundamental para sua atividade

responsiva e cooperativa com outros segmentos presentes na proteína desse gene para que ela pudesse aumentar a tolerância ao estresse oxidativo em tabaco (Liu et al., 2017).

Conclusão

Foram identificados 9 genes pertencentes a família PF00257 em soja e 9 em *Arabidopsis*, porém apenas 5 genes de soja apresentam ortólogos em *Arabidopsis*.

Todos os genes atuam no citoplasma, sendo 6 responsivos ao ABA por apresentarem 2 ou mais motivos ABRE em suas regiões promotoras, e 3 não responsivos ao ABA.

Todos as proteínas apresentaram domínio K conservado entre as espécies, sendo todas ativas no citoplasma das células.

Os alvos mais promissores para folhas e raízes de soja foram os Glyma.17G187600, Glyma.04G009400 e Glyma.09G185500 por apresentarem altas expressões nesses tecidos.

Referências

APROSOJA BRASIL - Associação Brasileira dos Produtores de Soja. **A soja**. c2018. Disponível em: <https://aprosojabrasil.com.br/a-soja/>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ARUMINGTYAS, E. L.; SAVITRI, E. S. Protein profiles and dehydrin accumulation in some soybean varieties (*Glycine max* L. Merr) in drought stress conditions. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 134-141, 2013.

BAO, F.; DU, D.; AN, Y.; YANG, W.; WANG, J.; CHENG, T.; ZHANG, Q. Overexpression of *Prunus mume* dehydrin genes in tobacco enhances tolerance to cold and drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 151, 2017. 12 p.

BRINI, F.; HANIN, M.; LUMBRERAS, V.; AMARA, I.; KHOUDI, H.; HASSAIRI, A.; PAGÈS, M.; MASMOUDI, K. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant cell reports**, v. 26, n. 11, p. 2017-2026, 2007.

FERREIRA, R. C. **Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil**. 2016. 98 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

FRANCESCHINI, A.; FRANCESCO, F. de; BARNE, G. C.; FERREIRA, J. P. B.; ZUPELLI, N. de M. **Cadeia global de valor: setor agronegócio: soja**. São Paulo: ESPM, 2017. 37 p. Disponível em: <https://ri.espm.br/wp-content/uploads/2018/08/Setor-da-soja-1.pdf>. Acesso: 21 jun. 2021.

HUGHES, S.; GRAETHER, S. P. Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. **Protein Science**, v. 20, n. 1, p. 42-50, 2011.

IPCC - Painel intergovernamental sobre mudanças climáticas. **Mudanças Climáticas**. c2011. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2011/11/painel-intergovernamental-sobre-mudancas-climaticas-ipcc>. Acesso em: 21 jun. 2021.

KUMAR, M.; LEE, S. C.; KIM, J. Y.; KIM, S. J.; AYE, S. S.; KIM, S. R. Over-expression of dehydrin gene, OsDhn1, improves drought and salt stress tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Biology**, v. 57, n. 6, p. 383-393, 2014.

LI, Q.; ZHANG, X.; LV, Q.; ZHU, D.; QIU, T.; XU, Y.; BAO, F.; HE, Y.; HU, Y. *Physcomitrella patens* dehydrins (PpDHNA and PpDHNC) confer salinity and drought tolerance to transgenic *Arabidopsis* plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 1316, 2017. 15 p.

LIU, H.; YU, C.; LI, H.; OUYANG, B.; WANG, T.; ZHANG, J.; WANG, X.; YE, Z. Overexpression of ShDHN, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. **Plant Science**, v. 231, p. 198-211, 2015.

LIU, Y.; WANG, L.; ZHANG, T.; YANG, X.; LI, D. Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, article 7361, 2017. 10 p.

MALIK, A. A.; VELTRI, M.; BODDINGTON, K. F.; SINGH, K. K.; GRAETHER, S. P. Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 709, 2017. 18 p.

MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; KIDOKORO, S.; MATSUKURA, S.; TAKASAKI, H.; SAKURAI, T.; YAMAMOTO, Y. Y.; YOSHIWARA, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cis-acting promoter elements in cold-and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. **DNA Research**, v. 19, n. 1, p. 37-49, 2012.

SARUHAN-GÜLER, N.; TERZI, R. Dehydrins: an overview of current approaches and advancement. **Turkish Journal of Botany**, v. 44, n. 5, p. 481-492, 2020.

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.

YAMASAKI, Y.; KOEHLER, G.; BLACKLOCK, B. J.; RANDALL, S. K. Dehydrin expression in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 213-220, 2013.