

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, Liliâne 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.)

Caracterização da proteína FAR1 (Fatty-acid and retinol binding protein) do nematoide de cisto da soja *Heterodera glycines*

PINTO, R. A. S.¹; HISHINUMA-SILVA, S. M.²; NOMURA, R. B. G.³; LOPES-CAITAR, V. S.⁴; DIAS, W. P.⁵; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.⁵

¹UENP, reennan.augusto@outlook.com; ²Pós-doutorado, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Soja; ³UEL, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia; ⁴Department of Plant Sciences, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, EUA; ⁵Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A cultura da soja tem grande importância econômica para o Brasil, sendo que na safra de 2020/2021 foi obtido um crescimento de 5,6% na produção, que culminou para que o país se tornasse o maior produtor e exportador da leguminosa (Conab, 2021). No entanto, devido ao seu amplo cultivo e às condições ambientais favoráveis no território nacional, a mesma é afetada constantemente por diversos fatores abióticos e bióticos, como é o caso dos nematoides fitopatogênicos, os quais apresentam difícil controle e causam danos significativos às culturas. Dentre as principais espécies que infectam a soja no Brasil, merecem destaque os formadores de galha do gênero *Meloidogyne* spp., *M. javanica* e *M. incognita*, o nematoide formador de cistos *Heterodera glycines*, o reniforme *Rotylechus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus*. O nematoide de cisto da soja (NCS) teve sua primeira detecção, no Brasil, no Cerrado em 1991/92, além disso, atualmente, as estimativas apontam que cerca de 3 milhões de hectares estão infestados com esse fitopatógeno, segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia. Ademais, as perdas devido aos nematoides são estimadas em 35 bilhões ao ano para o agronegócio brasileiro (Machado, 2015).

Os vermes do gênero *Heterodera* são caracterizados por hábito sedentário, assim como a formação de cistos, os quais são resultantes da fêmea adulta, quando morta, no final do ciclo infeccioso. Esses organismos apresentam mecanismos sofisticados para o processo de infecção das plantas hospedeiras, envolvendo a formação de locais de alimentação especializados,

principalmente, nas raízes das plantas, como os sincícios (Ali et al., 2018). Para o sucesso na infecção e estabelecimento do parasitismo, esses parasitas utilizam seu estilete para secretar determinadas moléculas, essas denominadas como efetoras, no interior das células do hospedeiro (Lima et al., 2017). Tal processo resulta em alterações da expressão gênica do hospedeiro, seja para modular ou inibir a resposta de defesa da planta, facilitando a formação e manutenção dos sítios de alimentação, essenciais para obtenção dos nutrientes para que o nematoide complete o ciclo de vida (Engler et al., 2010). Então, vários genes importantes para o parasitismo têm sido identificados e caracterizados nos diferentes fitonematoides, como exemplo as proteínas β -1,4-endoglucanase, que atua na degradação da parede celular da planta, FAR-1 (ácido graxo e proteína de ligação ao retinol), que altera a via de sinalização do ácido jasmônico nos hospedeiros (Rehman et al., 2009). Essa proteína foi descrita nos nematoides sedentários como *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *Heterodera glycines* (Phani et al., 2017). Ainda assim, trabalhos anteriores da Equipe demonstraram que esta proteína é importante e está presente nos diferentes nematoides que infectam a soja com base em análises de similaridade, conforme Hishinuma-Silva (2019).

A FAR-1 tem como função ligar-se as moléculas lipídicas do hospedeiro, dessa forma, atuam no sequestro, no transporte e metabolismo das moléculas lipofílicas, isto é, substâncias hidrofóbicas que possuem características apolares, como exemplos: ácidos graxos e esteroides, os quais podem ser, inclusive, hormônios (Vieira et al., 2017). Então, a proteína FAR-1 pode auxiliar no processo de inibitório de defesa da planta hospedeira, pois compromete a síntese de ácido linoleico e linolênico, os quais são precursores para a síntese de ácido jasmônico, o qual está intrinsecamente relacionado à resposta de defesa da planta a estes parasitas (Phani et al., 2017).

Neste trabalho, a proteína FAR-1 do nematoide *Heterodera glycines* foi identificada sendo demonstrado seu envolvimento no parasitismo com base no seu perfil e local de expressão no nematoide durante a infecção.

Material e Métodos

Caracterização *in silico* e análises comparativas da proteína FAR1

As sequências gênicas para a caracterização molecular da proteína FAR1 foram obtidas no banco de dados Wormbase Parasite Data (Howe et al., 2017), enquanto os dados de *P. brachyurus* foi obtido do estudo realizado por Lopes-Caitar (2018). Para identificar os domínios conservados, as sequências de aminoácidos foram analisadas usando o NCBI Conserved Domain Database (Marchler-Bauer et al., 2015). Além disso, o programa SignalP 4.1 (Nielsen, 2017) foi usado para prever o sinal de secreção putativo. Os domínios transmembrana foram avaliados usando o programa TMHMM (Krogh et al., 2001), enquanto a localização celular foi prevista pelo programa TargetP (Emanuelsson et al., 2000). O potencial endereçamento ao retículo endoplasmático foi identificado usando o programa Predotar (Liu et al., 2013). A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo de Neighbor-joining através do programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) com 1000 repetições.

Hibridização *in situ*

Os iniciadores específicos dos genes FAR1 de *H. glycines* foram sintetizados para obter sondas de RNA com amplicon de aproximadamente 200 pb sense e anti-sense marcado com digoxigenina (DIG). A hibridização *in situ* foi conduzida utilizando 10,000 indivíduos J₂ *H. glycines*. Após a hibridização, a sonda foi detectada através do anticorpo antidigoxigenina conjugada à fosfatase alcalina (diluída 1:100) e os nematoides marcados foram fotografados em microscópio Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss Corporation) e processada com o software MOTIC (versão 2.0).

Perfil de expressão do gene candidato FAR1 na interação com a soja

Para se avaliar o perfil de expressão do gene candidato, foi realizada a extração do RNA total de raízes de soja infectadas com *H. glycines* e coletadas em diferentes períodos de tempo (1/2, 1, 2, 5, 10, 15 e 21 dias após a inoculação), usando o método TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen), seguido pela

síntese de cDNA utilizando SuperScript III Kit (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em um termociclador StepOnePlus™ System (Thermo Fisher Scientific) usando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Como normalizador foi utilizado o gene actin, e como calibrador foi utilizado o tempo 21d. A expressão do gene FAR1 foi calculada através do software Rest2009 (Rest ..., 2009).

Resultado e Discussão

A proteína predita FAR1 de *H. glycines* apresenta uma sequência de DNA de 1245 pb, sendo composta de 8 éxons, codificando uma proteína com 186 aminoácidos (Tabela 1). Comparativamente, embora a proteína apresente maior número de éxons, os domínios conservados são semelhantes nos variados tipos de nematoides analisados. Conforme a Tabela 1, pode ser observado nas sequências proteicas no gênero *Heterodera* a presença de peptídeo sinal, ou seja, indicativo de sinal de secreção destas proteínas, além do domínio conservado Gp-FAR-1. Todavia, não foi observado a presença de um domínio transmembrana. Dessa forma, observa-se uma proteína candidata a ser considerada e analisada secretada.

Tabela 1. Caracterização molecular da proteína FAR-1.

Espécies					
	<i>M. javanica</i>		<i>M. incognita</i>		<i>H. glycines</i>
Nomenclatura	MJ-FAR1-1	MJ-FAR1-2	MI-FAR1	HG-FAR1-1	HG-FAR1-2
Gene (pb)	803	804	802	1244	1245
Região codificadora (pb)	567	573	570	561	561
Proteína (aa)	188	190	189	186	186
Núm. Exon	6	6	6	8	8
Orientação	Reverso (3'-5')	Contínuo (5'-3')	Reverso (3'-5')	Contínuo (5'-3')	Reverso (3'-5')
Signal P	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Continua...

Tabela 1. Continuação.

	Espécies				
	<i>M. javanica</i>		<i>M. incognita</i>		<i>H. glycines</i>
TMHMM	Não	Sim	Não	Não	Não
Target P	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Predotar	ER	ER	ER	ER	ER
Conserved domain	Gp-FAR-1 superfamily	Gp-FAR-1 superfamily	Gp-FAR-1 superfamily	Gp-FAR-1 superfamily	Gp-FAR-1 superfamily

A análise filogenética demonstrou a relação das proteínas preditas de FAR-1 entre os nematoides capazes de infectar a soja e o de vida livre *Caenorhabditis elegans* (Figura 1). Como esperado, as proteínas dos fitonematoídeos se agruparam separadamente do nematoídeo de vida livre, *Caenorhabditis elegans*. Além disso, as sequências de aminoácidos de *Meloidogyne* foram mais semelhantes com a de *P. brachyurus* do que com o *H. glycine*. Ao analisar a relação entre as duas espécies de *Meloidogyne*, foi possível identificá-las no mesmo ramo da árvore filogenética (Figura 1). Portanto, os dados obtidos revelam que a proteína FAR-1 é conservada entre as espécies em estudos e, sendo mais similar entre os nematoides endoparasitas, logo, possivelmente relacionada com o processo parasitário dos gêneros *Heterodera* e *Meloidogyne* em relação ao gênero *Pratylenchus*, o qual é um nematoídeo migrador.

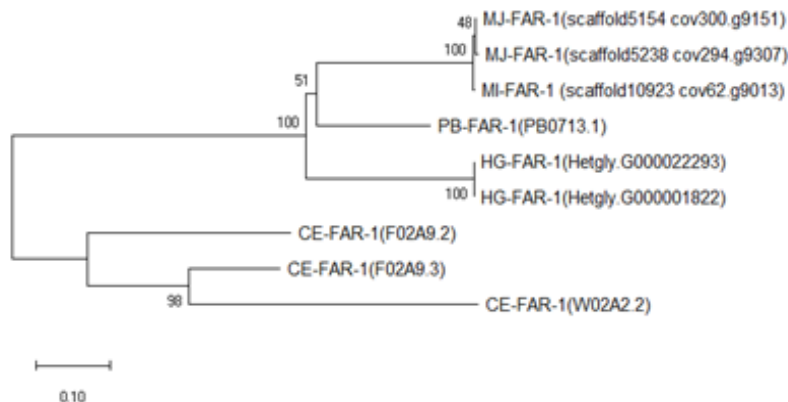


Figura 1. Árvore filogenética das proteínas FAR1.

Adicionalmente, o candidato a efetor Hg-FAR-1 foi detectado na hipoderme do nematoide, diferentemente de outros locais de produção de efetores, ou seja, nas glândulas esofágicas. A sonda controle, conforme observada nas imagens posteriores, não apresentou sinal (Figura 2). Ressalta-se que outros efetores, ou seja, genes de parasitismo, já foram descritos como sendo expressos na hipoderme (Baum et al., 2007).

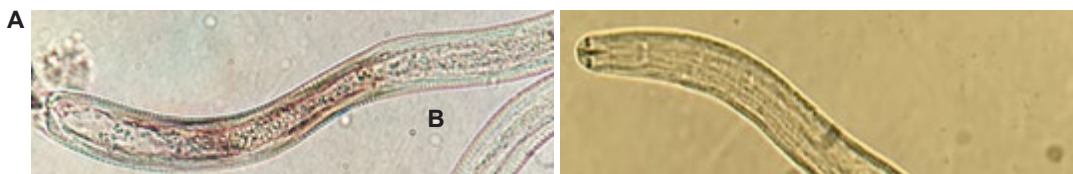


Figura 2. Localização do gene FAR-1 no nematoide de cisto: Antisense Hg-FAR-1 (A); Sense Hg-FAR-1 (B).

A análise da expressão do gene FAR-1, ao longo da infecção do nematoide, demonstrou que esse gene foi expresso nos tempos de 1 dia e 2 dias, indicando sua importância nas fases iniciais do processo infeccioso (Figura 3). Nos tempos posteriores a 2 dias, o nível de expressão tornou-se reduzido, possivelmente porque os nematoides já haviam penetrado e avançado no estabelecimento do parasitismo.

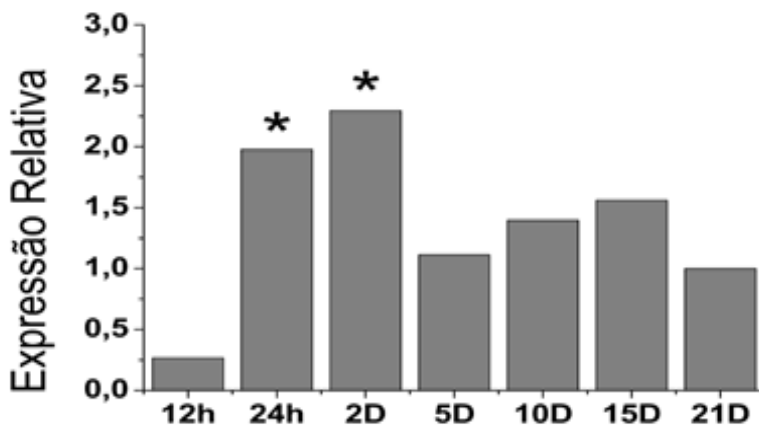


Figura 3. Perfil de expressão do gene FAR-1 ao longo da infecção do nematoide *Heterodera glycines* em raízes de soja.

Conclusão

O gene FAR-1 está presente em *H. glycines* e tem importante papel no parasitismo desse nematoide durante a infecção com a soja, sendo expresso na hipoderme do nematoide e nos tempos iniciais logo após a infecção. Os resultados apresentados aqui demonstraram que esta proteína desempenha um papel importante nos estágios iniciais do parasitismo, o que pode estar associado às fases de penetração e formação de sincícios.

Referências

ALI, M.; ANJAM, M.; NAWAZ, M.; LAM, H.; CHUNG, G. Signal transduction in plant-nematode interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 1648, 2018. 18 p.

BAUM, T.; HUSSEY, R.; DAVIS, E. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. **Genetic Engineering**, v. 28, p. 17-43, 2007.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2020/2021, 4º. levantamento**, jan. 2021. 85 p. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 10 jun. 2021.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.

ENGLER J. de A.; RODIUC, N.; SMERTENKO, A.; ABAD, P. Plant actin cytoskeleton remodeling by plant parasitic nematodes. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, p. 213-217, 2010.

HISHINUMA-SILVA, S. M. **Caracterização funcional do gene GmHsp22.4 de soja envolvido na resposta de resistência a *Meloidogyne javanica* e identificação de proteínas efetoras de nematoides sedentários envolvidos na interação com a soja**. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

HOWE, K. L.; BOLT, B. J.; SHAFIE, M.; KERSEY, P.; BERRIMAN, M. WormBase ParaSite - a comprehensive resource for helminth genomics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 215, p. 2-10, 2017.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LIMA, F. S. O.; CORREA, V. R.; NOGUEIRA, S. R.; SANTOS, P. R. R. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. In: KASAI, M. (Ed.). **Soybean – the basis of yield, biomass and productivity**. London: IntechOpen, 2017. p. 95 -110. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/soybean-the-basis-of-yield-biomass-and-productivity/nematodes-affecting-soybean-and-sustainable-practices-for-their-management>. Acesso em: 18 jun. 2021.

LIU, L.; ZHANG, Z.; MEI, Q.; CHEN, M. PSI: a comprehensive and integrative approach for accurate plant subcellular localization prediction. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e75826, 2013.

LOPES-CAITAR, V. S. **Estudos moleculares do patossistema *Glycine max-Pratylenchus brachyurus***: de estratégias de infecção do patógeno e de defesa do hospedeiro, à interação proteína-proteína. 2018. 105 f. Tese (Doutorado) - Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MACHADO, A. C. Z. Ataques de nematoides custam R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Revista Agrícola**, 16 nov. 2015. Disponível em: <http://www.ragricola.com.br/destaque/ataques-de-nematoides-custam-r-35-bilhoes-ao-agronegocio-brasileiro>. Acesso em: 18 jun. 2021.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, D222-D226, 2015.

NIELSEN, H. Predicting secretory proteins with SignalP. In: KIHARA, D. (Ed.). **Protein function prediction: methods in Molecular Biology**, v. 1611. New York: Springer; 2017. p. 59-73.

PHANI, V.; SHIVAKUMARA, T. N.; DAVIES, K. G.; RAO, U. Meloidogyne incognita fatty acid- and retinol- binding protein (Mi-FAR-1) affects nematode infection of plant roots and the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, article 2122, 2017. 13 p.

REHMAN, S.; BUTTERBACH, P.; POPEIJUS, H.; OVERMARS, H.; DAVIS, E.; JONES, J.; GOVERSE, A.; BAKKER, J.; SMANT, G. Identification and characterization of the most abundant cellulases in stylet secretions from *Globodera rostochiensis*. **Phytopathology**, v. 99, p. 194-202, 2009.

REST 2009 Software User Guide. [Hilden]: QIAGEN, 2009. 28 p.

VIEIRA, P.; KAMO, K.; EISENBACK, J. Characterization and silencing of the fatty acid- and retinol-binding Pp-far-1 gene in *Pratylenchus penetrans*. **Plant Pathology**, v. 66, n. 7, p. 1214-1224, 2017.