



I SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA SIMBBTEC2011

Londrina - Pr 25 a 27 de agosto de 2011

Biblioteca Subtrativa de Raízes de Soja em Resposta à Inoculação de *Bradyrhizobium japonicum*

Gesiele Almeida Barros de Carvalho^{1,2}, Jesiane Stefânia da Silva Batista² Francismar
Corrêa Marcelino² e Mariangela Hungria²

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr - E-mail: ge_barros1@hotmail.com

²Embrapa Soja, Caixa Postal 231- 86001-970 Londrina - Pr.

RESUMO

A soja é de grande importância, principalmente devido ao seu elevado teor proteico, razão pela qual apresenta grande exigência em nitrogênio, que pode ser totalmente suprida pelo processo da fixação biológica de nitrogênio. O estabelecimento da simbiose soja-*Bradyrhizobium sp.* gera inúmeros benefícios e estudos avançados de genética podem auxiliar no desenvolvimento de etapas críticas, permitindo a melhoria do processo. Uma ferramenta importante para essa estratégia é a prospecção de genes. Neste trabalho construiu-se uma biblioteca subtrativa de cDNA de raízes de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*. Os clones foram sequenciados e procedeu-se à montagem, resultando em 3.776 sequências diferencialmente expressas. As sequências foram então categorizadas de acordo com os principais processos biológicos. Neste trabalho as categorias apresentadas se referem aos processos catabólicos, de metabolismo secundário, de sinalização e síntese de hormônios. Dentro dessas categorias alguns genes que podem apresentar potencial biotecnológico foram selecionados para confirmação da expressão gênica.

Palavras-chave: Expressão gênica, fixação biológica de nitrogênio, prospecção de genes, *Glycine max*.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é de grande importância mundial, com alto valor econômico atribuído principalmente ao teor elevado de proteínas presentes nos grãos. Devido à alta demanda de N necessária para a síntese de proteínas e outras biomoléculas, esse nutriente geralmente representa um fator limitante para a produtividade de soja (Panzieri et al., 2000). A leguminosa tem a capacidade de suprir a maioria das exigências de N pelo estabelecimento da simbiose com bactérias pertencentes principalmente às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, capazes de converter o nitrogênio atmosférico (N₂) em formas assimiláveis pela planta (Graham et al., 2003). O estabelecimento simbiótico envolve um complexo diálogo molecular entre o hospedeiro e o microssimbionte. E inúmeras mudanças na expressão gênica ocorrem em ambos durante o processo de nodulação (Vance, 2002). A inoculação de sementes de soja com estirpes selecionadas de *B. japonicum* e *B. elkanii* representa uma tecnologia favorável ao ambiente, que pode suprir a necessidade de N de cultivares altamente produtivas, permitindo uma grande economia em comparação com a aplicação de fertilizantes nitrogenados (Hungria et al., 2006). Análises genéticas avançadas estão

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 6001 CEP – 86.051 - 990
Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br



I SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA SIMBBTEC2011

Londrina - Pr 25 a 27 de agosto de 2011

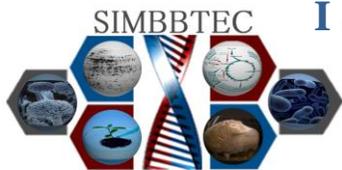
permitindo uma melhor compreensão da simbiose soja-*Bradyrhizobium* (Stacey et al., 2006). Esse trabalho, que encontra-se inserido no macroprojeto GenoSoja, visa melhorar a nossa compreensão sobre o estabelecimento simbiótico; para isso, foi construída uma biblioteca subtrativa de cDNA (Diatchenko et al., 1996) em raízes de soja na presença da estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*, com o objetivo de prospectar genes diferencialmente expressos em resposta à simbiose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de soja, cultivar Conquista, foram desinfetadas superficialmente e pré-germinadas por três dias. Paralelamente, a estirpe CPAC 15 (=SEMIA 5079) de *B. japonicum* foi cultivada em meio de cultura para rizóbios até a fase exponencial de crescimento. Radículas de soja foram então inoculadas com 1 mL planta⁻¹ de culturas contendo 10⁷ UFC mL⁻¹. O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições inoculadas e três não inoculadas, cada uma com 20 plantas. As plantas foram cultivadas em condições controladas de casa de vegetação e, dez dias após a inoculação, as raízes foram coletadas. Procedeu-se à extração do RNA das raízes, ao isolamento do mRNA e à construção da biblioteca de cDNA através da técnica de hibridização subtrativa supressiva (Kit Clontech), onde apenas os genes expressos nas plantas pelo efeito da inoculação foram exponencialmente amplificados. Tais genes foram sequenciados através da tecnologia Illumina (Fasteris S.A., Suíça) e, com o uso de ferramentas de bioinformática, realizou-se a montagem e análise das sequências obtidas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A biblioteca subtrativa foi submetida a 76 ciclos de sequenciamento, gerando 4.621.072 leituras (*reads*). O conjunto de *reads* dessa biblioteca gerou um total de 3.776 sequências diferencialmente expressas. Cerca de 3.210 sequências foram anotadas através do programa AutoFACT (Koski et al., 2005), onde 566 sequências não identificadas (sem *hits*) foram excluídas. As sequências resultantes foram agrupadas de acordo com o processo biológico, onde algumas categorias estão apresentadas na Tabela 1, indicando alguns genes com alta probabilidade de desempenharem uma papel relevante no estabelecimento da simbiose. A seleção dos genes neste trabalho foi baseada no número de *reads* encontrados na biblioteca referente a cada sequência e também no número de RPKM (Reads per kilobase of exon model per million mapped reads), uma medida utilizada para quantificar o nível de expressão dos transcritos (Mortazavi et al., 2008). Os genes incluídos no processo catabólico podem estar relacionados com a degradação da parede celular vegetal, devido à necessidade de sua reorganização (Minic, 2008). No metabolismo secundário os produtos em destaque estão envolvidos com a síntese de flavonoides, responsáveis pelo início da sinalização molecular entre a planta hospedeira e o rizóbio e que desencadeiam a formação de nódulos (Limpens; Bisseling, 2003; Cooper, 2007;). Finalmente, na categoria dos hormônios, foram selecionados três genes que também desempenham um papel importante na simbiose (Ferguson et al., 2010).



I SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA SIMBBTEC2011

Londrina - Pr 25 a 27 de agosto de 2011

Tabela 1- Alguns genes diferencialmente expressos em raízes de soja na presença do rizóbio.

Processo biológico	EST/Gene model	Definição	Nº. Reads	RPKM
<i>Processo catabólico</i>	Glyma08g29090.1	Glicosídeo hidrolase	1.319	1177.12
	Glyma18g51980.1	Glicosídeo hidrolase	1.122	1027.26
<i>Metabolismo secundário</i>	Contig12722	Naringenina-chalcona sintase	12.213	6717.43
	Contig28769	Isoflavona conj.-especifico β -glicosidase	3.893	1593.64
	Contig11277	Isoflavona sintase	1.407	732.114
<i>Sinalização</i>	Contig14091	Proteína rica em Leucina	158.479	210781
	Contig5707	Proteína quinase	1.694	1269.58
	Glyma13g03910.1	Calmodulina	1.940	2424.67
<i>Hormônios</i>	Contig28200	Brassinosteroide	1.253	1500.96
	Contig18308	Etileno	2.846	1693.65
	Contig11292	Jasmonato	1.347	1025

CONCLUSÕES

A construção e análise da biblioteca subtrativa mostrou-se eficiente para o isolamento de genes diferencialmente expressos nas raízes de soja em resposta à bactéria fixadora de nitrogênio. Os resultados obtidos até o presente momento permitirão incrementar o conhecimento do estabelecimento da simbiose e do processo de fixação biológica do nitrogênio, crítico para a sustentabilidade agrícola no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cooper, J.E. (2007), Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p. 1355–1365.
- Diatchenko, L. et al. (1996), Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 93, p. 6025-6030.
- Ferguson, B.J. et al. (2010), Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, p. 61–76.
- Graham, P.H. e Vance, C.P. (2003), Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, v. 131, p. 872–877.
- Hungria, M. et al. (2006), Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: Singh RP, Shankar N, Jaiwal PK (ed) *Nitrogen nutrition in plant productivity*. Houston, Studium Press, pp 43-93.
- Koski, L.B. et al. (2005), AutoFACT: an automatic functional annotation and classification tool. *BMC Bioinformatics*, v.6, p.151.
- Limpens, E. e Bisseling, T. (2003), Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, p. 343–350.
- Minic, Z. (2008), Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, v. 227, p. 723-740.
- Mortazavi, A. et al. (2008), Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nature Methods*, v. 5, p. 621–628.
- Panzieri, M. et al. (2000), Importance of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. *Ecological Modelling*, v. 135, p.301–310.
- Stacey, G. et al. (2006), Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 110–121.
- Vance, C.P. (2002), Root-bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation. In: Waisel Y, Eshel, A, Kafkati U. (eds) *Plant Roots. The Hidden Half*. 3 rd edition. New York, Marcel Dekker Publishers, pp. 839–867.