

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES ESTRESSE-INDUZIDOS EM SOJA SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

FUGANTI-PAGLIARINI, R.¹; RODRIGUES, F.A.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 plantas, em seu ambiente natural, estão expostas a diversas condições adversas. O déficit hídrico, juntamente com a alta salinidade, compreendem os fatores ambientais que mais afetam o crescimento e a produtividade vegetal inclusive de culturas de importância econômica, como a soja. Nos últimos anos, a ocorrência de períodos prolongados de estiagem, principalmente durante o verão, tem se tornado cada vez mais frequente. Logo, prejuízos financeiros significativos em diversas regiões produtoras têm ocorrido (MANAVALAN et al., 2009). Portanto, o desenvolvimento de plantas de soja mais tolerantes à seca se tornou foco fundamental das pesquisas científicas, principalmente através de estudos relacionados à regulação da expressão gênica, que buscam entender como a maquinaria celular e molecular ativa e regula a expressão de genes (transcriptoma) responsivos a estresses abióticos.

Além da importância de prospectar genes envolvidos na resposta da planta ao estresse, a busca por promotores induzidos nestas condições adversas tem se tornado cada vez mais importante em soja (MARUYAMA et al., 2012). Os promotores são regiões localizadas a uma curta distância da extremidade 5' de um gene, responsáveis pela ativação e regulação da expressão gênica, através da ligação de fatores de transcrição nos *cis*-elementos presentes nestas sequências, e que sinalizam para a indução de respostas a diversos estresses.

Dentre as cascatas de transdução de sinais envolvidos na resposta ao déficit hídrico, encontram-se genes induzidos e não induzidos por ABA (ácido abscísico) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Na região promotora dos genes responsivos ao ABA os principais *cis*-elementos identificados foram ABRE (CHOI et al., 2000; Uno et al., 2000), sítios de reconhecimento MYC (ABE et al., 1997), MYB (URAO et al., 1993) e NAC (TRAN et al., 2004) e na região promotora dos genes da rota independente de ABA encontra-se os *cis*-elementos DRE (LIU et al., 1998).

Assim, o perfil de expressão gênica da cultivar de soja Embrapa 48, tolerante ao déficit hídrico, foi analisado através de microarranjos de cDNA, em plantas submetidas a déficit hídrico moderado - DHM (dois dias sem irrigação) e severo - DHS (seis dias sem irrigação). A partir desse perfil foram escolhidos transcritos que apresentaram FC > 20 e cujos promotores continham *cis*-elementos de resposta à seca. A validação de transcritos identificados como diferencialmente expressos foi realizada via RT-qPCR nas cultivares Embrapa 48 (brasileira), Williams 82 (americana) e Nourin2 (japonesa) submetidas à suspensão da irrigação por dois, quatro e seis dias consecutivos. Depois de validados, os genes escolhidos foram submetidos a uma busca por putativos *cis*-elementos envolvidos na resposta à seca, em suas sequências promotoras.

Os resultados identificaram 6.237 e 18.547 transcritos diferencialmente expressos em resposta ao déficit hídrico moderado e severo, respectivamente. No DHM foram identificados 2.924 transcritos *up* regulados (FC > 2) e 3.313 *down* regulados (FC < -2). Já as plantas submetidas ao DHS 8.866 transcritos *up* regulados (FC > 2) e 9.681 *down* regulados (FC < -2) foram identificados. Entre os transcritos *up* regulados, 1.963 foram identificados como diferencialmente expressos em ambas as condições de déficit hídrico, 751 apenas no déficit moderado e 6.717 no severo. Quanto aos transcritos *down* regulados, 2.557 foram reprimidos em ambos os

tratamentos, 570 identificados unicamente no déficit hídrico moderado e 6.914 no severo. Duzentos e dez transcritos foram superexpressos no déficit moderado e reprimidos no severo e o oposto foi observado com outros 186 transcritos identificados como superexpressos no déficit hídrico severo e reprimidos no moderado. Dentre os genes identificados nos tratamentos de déficit hídrico, 3.717 foram classificados de acordo com as funções moleculares do Gene Ontology. Os transcritos que apresentaram maior expressão no DHS foram classificados na classe das desidrinas e proteínas LEA, seguidos da classe de ubiquitinação e metabolismo de outros aminoácidos. Dados semelhantes foram obtidos para os transcritos diferencialmente expressos no DHM, com exceção da classe de ubiquitinação, uma vez que neste tratamento a maior expressão ocorreu para a classe de metabolismo de lipídios. O perfil de expressão para os transcritos identificados como *down* regulados foi semelhante em ambos os tratamentos. Dentre esses transcritos estão os da classe da fotossíntese, biossíntese de outros metabólitos secundários e metabolismo e biodegradação de xenobióticos.

Para validar os resultados obtidos com os microarranjos de cDNA, o perfil de expressão de alguns transcritos diferencialmente expressos, que apresentaram FC>20 nas plantas submetidas a um ou ambos os tratamentos de déficit hídrico, foi analisado em amostras das cultivares Embrapa 48, Nourin2 e Williams 82 sob condições de déficit hídrico. Os resultados mostraram que todas as cultivares apresentaram murcha progressiva no decorrer dos dias sem irrigação, sendo este efeito mais pronunciado no sexto dia do tratamento experimental. A análise da expressão gênica indicou que na cultivar Embrapa 48 os valores de expressão gênica foram maiores no déficit hídrico severo (seis dias de desidratação) para os genes que codificam as proteínas homeobox zíper de leucina, expansina-like B1-like e asparagina sintase quando comparado às cultivares Williams 82 e Nourin2. Para o gene codificador da proteína de maturação de semente PM34, a cultivar Embrapa 48 apresentou maior expressão que a cultivar Nourin2. Para o gene da expansina-like B1-like, os maiores valores de expressão foram identificados no déficit hídrico moderado nas cultivares Embrapa 48 e Nourin2. Contudo, para o gene Hsp26/Hsp42 a maior expressão (quatro dias de déficit hídrico) foi detectada na cultivar Williams 82.

A partir dos dados de expressão e anotação foram escolhidos genes com funções de chaperona molecular (HSP26/42, Glyma14g11420), desidrinas Mat1 e Mat9 (*Maturation-associated protein 1 e 9* - Glyma07g10030, Glyma09g31740, respectivamente), LTI (*Low Temperature Induced* - Glyma20g29770) e Glyma11g16120 (cuja função é desconhecida no presente momento) para análise *in silico* dos *cis*-elementos responsivos a estresses abióticos, presentes na região promotora.

Na região promotora do gene *LTI* foram identificados os *cis*-elementos ABRE (3x), ABF (1x), MYC (10x) e MYB (11x). Os promotores dos genes *Mat1* e *Mat9* também apresentaram os *cis*-elementos ABRE (5x), MYCR (5x) e sete MYB (7x) para *Mat1* e ABREs (6x), MYCR (7x) e MYBR (8) para *Mat9*.

Os promotor do Glyma11g16120 apresentou poucos putativos *cis*-elementos ABRE (2x), MYCR (7x) e MYBR (5x) presentes em sua região promotora. O promotor do gene HSP26/42 não foi analisado em função da ausência de sua sequência.

Esses resultados sugerem que os promotores dos genes *LTI* (Glyma20g29770), *Mat1* (Glyma07g10030) e *Mat9* (Glyma09g31740) são considerados fortes candidatos para o uso em estratégias de engenharia genética para pesquisa básica, podendo ser utilizados como na obtenção de plantas geneticamente modificadas mais tolerantes a estresses abióticos como o déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, IWASAKI T, HOSOKAWA D, SHINOZAKI, K (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell Online**. 9: 1859–68.
- CHOI H, HONG J, HA J, KANG J, KIM SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **The Journal of Biological Chemistry**. 275: 1723–30.
- LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. 10: 1391-1406.
- MANAVALAN LP, GUTTIKONDA SK, TRAN LSP, NGUYEN HT (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant and Cell Physiology**. 50: 1260-1276.
- MARUYAMA K, TODAKA D, MIZOI J, YOHISDA T, KIDOKORO S, MATSUKURA S, TAKASAKI H, SAKURAI T, YAMAMOTO YY, YOSHIWARA K, KOJIMA M, SAKAKIBARA H, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2012) Identification of cis acting promoter elements in cold and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. **DNA Research**. 19: 37–49.
- SHINOZAKI K & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**. 58: 221-227.
- TRAN LSP, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, SIMPSON SD, FUJITA Y, MARUYAMA K, FUJITA M, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. **The Plant Cell Online**. 16: 2481–98.
- UNO Y, FURIHATA T, ABE H, YOSHIDA R, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**. 97: 11632 – 11637.
- URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO S, SHINOZAKI K (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. **The Plant Cell Online**. 5: 1529-1539.