

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM SOJA EM RESPOSTA À *Phakopsora pachyrhizi* PELA METODOLOGIA ACP

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIAL EXPRESSION GENES IN SOYBEAN IN RESPONSE TO *Phakopsora pachyrhizi* BASED ON ACP METHODOLOGY

POLIZEL-PODANOSQUI, A.M.¹; PEREIRA, R.M.²; STOLF-MOREIRA, R.³; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.⁴; ABDELNOOR, R.V.⁴.

¹ Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial 1, Embrapa Soja, Londrina, PR; e-mail: polizel@cnpso.embrapa.br;

² Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS;

³ Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR;

⁴ Embrapa Soja, Londrina, PR.

Resumo

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma doença foliar destrutiva em quase todos os países produtores de soja. Ferramentas biotecnológicas podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de resposta de defesa a este fungo em nível molecular e conseqüentemente no controle da doença. Para identificar genes envolvidos em resposta à infecção com FAS, RNA de folhas infectadas e não infectadas de genótipos de soja resistente (PI561356) e suscetível (BRS 184), foram analisadas pela metodologia ACP (*Annealing Control Primer*). Quarenta ACPs foram utilizados para identificar e sequenciar 59 genes diferencialmente expressos (DEGs) e 44 destes genes mostraram homologia com proteínas conhecidas e foram identificados como envolvidos principalmente em fotossíntese, síntese e degradação de proteínas. A maioria dos DEGs que foi induzida nas plantas resistentes estava envolvida na categoria funcional de defesa, energia, atividade antioxidante e transporte celular. Quatro genes com diferentes padrões de expressão foram selecionados e caracterizados por meio de análises de RT-qPCR para obter um perfil de expressão específico nos genótipos de soja resistente (PI561356), tolerante (BRS 231) e suscetível (BRS 184). Análises de RT-qPCR revelaram que as respostas iniciais são mais intensas nas plantas resistentes. Adicionalmente, foi possível identificar o gene tiazol como candidato para estudos mais detalhados de seu envolvimento com a resistência a FAS.

Introdução

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das mais agressivas doenças foliares que acometem a cultura, podendo causar danos na produção de até 80%. A forma mais econômica de controle da doença é a utilização de cultivares resistentes. Até o momento foram identificados cinco loci contendo genes de resistência patógeno-específico, sendo denominados de Rpp1, Rpp2, Rpp3, Rpp4 e Rpp5 (MORALES et al., 2012). Estudos moleculares da interação soja - *P. pachyrhizi* têm sido realizados na tentativa de entender como ocorrem os mecanismos de resposta de defesa da soja a infecção. Estes estudos permitiram identificar perfis de transcritos de mRNA em soja infectada com FAS, demonstrando uma resposta bifásica de expressão gênica diferenciada entre plantas suscetíveis e resistentes (VAN DE MORTEL et al., 2007). Para a obtenção dos transcritos diferencialmente expressos estão disponíveis diferentes ferramentas biotecnológicas, entre elas, as mais utilizadas nas análises de transcritos em soja infectadas com FAS tem sido microarranjos de DNA e bibliotecas de SSH, que permitem a obtenção de uma ampla gama de transcritos e a análise global da interação soja - *P. pachyrhizi*. Aliada a essas, a metodologia ACP pode auxiliar na obtenção de transcritos em um curto período de tempo, além de gerar uma reduzida quantidade de transcritos que permite uma sondagem pontual das sequências diferencialmente expressas. O objetivo deste trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) em soja infectada com o fungo causador da FAS, através da metodologia

ACP e quantificar a expressão de alguns desses genes envolvidos nos mecanismos de defesa da soja, em plantas com diferentes respostas à ferrugem.

Material e Métodos

O experimento para a análise da expressão diferencial pela metodologia ACP foi conduzido em casa-de-vegetação, na Embrapa Soja, Londrina, PR. Foram utilizadas sementes da cultivar BRS 184 (suscetível) e do genótipo PI561356 (resistente *Rpp1*). O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, em câmaras de crescimento. Após 20 dias as plantas foram transferidas para a casa-de-vegetação. Os inóculos de *P. pachyrhizi* consistiam de uma suspensão de uredinósporos diluídos em água destilada contendo 0,05% de Tween 20 para uma concentração final de 140.000 esporos/mL. As plantas falso-inoculadas receberam a suspensão contendo Tween 20 e água. Os tecidos foliares foram coletados em 1, 12, 24 e 192 horas após a inoculação (hai). No experimento para a validação, além dos genótipos BRS 184 e PI561356, foi incluída a cultivar BRS 231 (tolerante). O experimento também foi montado em DIC, com três repetições. As sementes foram plantadas em vasos em casa-de-vegetação. A inoculação foi feita conforme o experimento anterior. Os tratamentos correspondiam a 12, 24, 48, 72, 96 e 192 hai.

Para as análises pela metodologia ACP foi feita a extração do RNA total, quantificação e posteriormente, tratamento com DNase I. O RNA extraído dos tecidos foliares coletados em 1, 12 e 24 hai foram colocados em um mesmo tubo em concentrações equimolares para formar um *bulk* com horários iniciais. O RNA das amostras de 192 hai foi mantido separado. O mesmo foi feito para as amostras falso-inoculadas, tanto na BRS 184 quanto na PI561356, totalizando 4 diferentes *bulks*. A síntese do cDNA e as reações de PCR foram feitas utilizando o *Kit GeneSnare* (Sigma), conforme recomendações do fabricante. As bandas diferencialmente expressas foram purificadas do gel, clonadas, extraídas via mini-prep e sequenciadas. As sequências foram processadas utilizando o pacote Phred/Phrap/Consed e alinhadas pelos softwares CAP3 e Vector NTI. A identificação e categorização funcional das sequências foram feitas por busca de similaridade usando ferramentas disponíveis em bancos de dados públicos: NCBI (*National Center for Biotechnology information*), UNIPROT (*Universal Protein Resource*), GO (*Gene Ontology*), Phytozome, Soybase, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome*) e Blast2GO.

Para as análises de expressão diferencial por RT-qPCR foram selecionados seis possíveis DEGs identificados pelo método ACP. Foi realizada a extração do RNA total, quantificação das amostras e tratamento com DNase I. Os iniciadores foram desenhados pelo programa *Primer Express 3.0*. A reação de RT-qPCR foi montada utilizando o kit *Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG with Rox* (Invitrogen). O gene constitutivo *-actina* foi utilizado como referência endógena. As amostras falso-inoculadas foram utilizadas como calibradoras. O nível de expressão dos genes foi calculado pelo programa REST 2009.

Resultados e Discussão

Dos 40 iniciadores arbitrários testados para identificar os DEGs, 20 apresentaram fragmentos com diferentes intensidades e geraram 59 DEGs. O DEG foi considerado super expresso, quando foi obtido de fragmentos presentes apenas no material inoculado, ou com intensidade maior quando comparada ao material falso-inoculado. Ao contrário, o DEG com intensidade menor ou ausente no material inoculado, comparado ao controle, foi considerado reprimido.

O número de DEGs identificados nos primeiros horários foi menor do que os identificados no horário de 192 hai. Esse menor número de DEGs nas etapas iniciais da infecção pode ter sido devido ao uso de *bulk* englobando diversos tempos, o que pode ter mascarado a identificação das bandas diferencialmente expressas em cada tempo específico. Foram identificados nove DEGs na PI561356, correspondentes aos horários iniciais após a inoculação, dos quais oito estavam sendo mais expressos e um reprimido, enquanto no horário de 192 hai foram identificados 40 DEGs, sendo 29 super expressos e 11 reprimidos. Na BRS 184 foram obtidos 22 DEGs, sendo 20 reprimidos e apenas dois super expressos nos primeiros horários, enquanto que em 192 hai foram identificados 32 DEGs, sendo 14 super expressos e 18

reprimidos. Esse maior número de DEGs ativados nas plantas resistentes e reprimidos nas plantas suscetíveis sugere que muitos dos genes identificados possam estar diretamente envolvidos com a resposta de resistência.

Dos 59 fragmentos que foram identificados como DEGs, 44 revelaram similaridade com sequências conhecidas. A caracterização das sequências obtidas permitiu identificar similaridades com genes envolvidos em várias categorias funcionais, como apoptose, síntese, modificação e degradação de proteínas, fotossíntese, transporte, resposta a estresse, fatores de transcrição, processamento de RNA, entre outros. As funções celulares de fotossíntese e de síntese e degradação de proteínas foram as mais representadas entre as sequências obtidas. Apesar de terem sido identificados poucos DEGs diretamente envolvidos com a resposta a estresse, muitos dos genes identificados foram relacionados com a resposta de defesa em plantas contra determinados patógenos, inclusive ao fungo *P. pachyrhizi* (LINO, 2011).

Para validar o método ACP foram selecionados quatro DEGs: DEG 1 (Dinamin), DEG 15 (LTP - *Lipid Transfers Protein*), DEG 17 (Tiazol) e DEG 40 (Serina/treonina quinase) de acordo com sua possível relação com a resposta de defesa da soja à FAS, tendo em vista que, em análises realizadas anteriormente também foram encontradas sequências com similaridade a genes que apresentavam a mesma função (LINO, 2011).

A análise de expressão relativa por RT-qPCR permitiu a confirmação da expressão diferencial dos genes selecionados (Figura 1). No entanto, apesar de algumas diferenças observadas entre as duas técnicas (ACP e RT-qPCR), de um modo geral, o resultado foi similar.

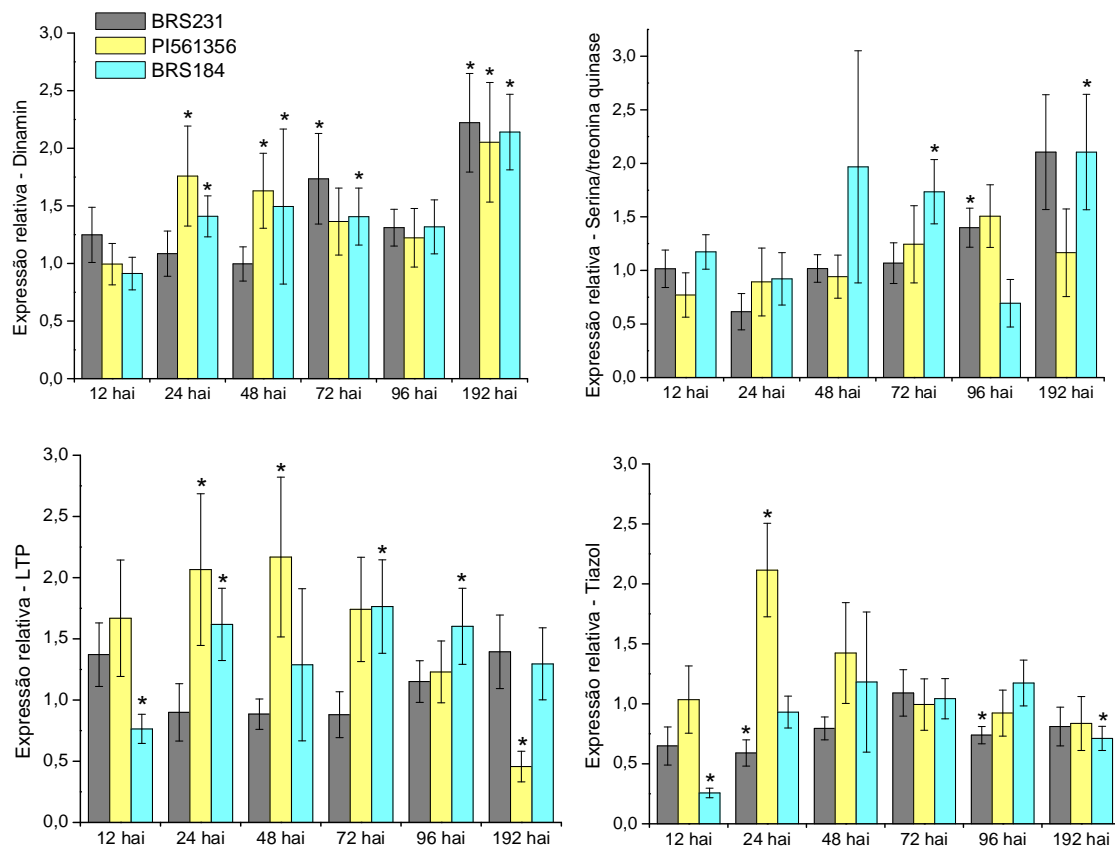


Figura 1: Quantificação relativa da expressão dos transcritos por qPCR. Nível de expressão relativa dos genes (eixo y) nos genótipos BRS 231, PI561356 e BRS 184 em 12, 24, 48, 72, 96 e 192 hai (eixo x). Análises estatísticas foram realizadas pelo programa REST 2009, onde $p < 0,05$ *.

A análise de expressão relativa do gene Dinamin (Glyma08g02700.1), que apresentam sítio de fosforilação induzido por elicitores (NÜHSE et al., 2007), demonstrou que o mesmo parece estar mais relacionado com a resposta de defesa basal, tendo em vista que o perfil de

expressão foi semelhante para todos os genótipos. O gene LTP (Glyma 01g32750.1) também parece estar envolvido com a resposta de defesa basal, porém não foi observado diferença de expressão nas plantas tolerantes, sua importância na defesa está relacionado com a inibição do crescimento do fungo, a formação de camadas protetoras e com a SAR (MALDONADO et al., 2002). No entanto, apesar dos genes Dinamin e LTP estarem envolvidos com resposta de defesa basal, a expressão inicial na PI561356 foi mais intensa do que nos outros genótipos.

O gene que codifica uma proteína serina treonina quinase (Glyma01g32400.1) que está envolvida na transdução de sinal, mediadas por genes R, e na cascata de fosforilação de proteínas (ZHOU et al., 1997), não está envolvido com a resistência uma vez que não foi ativado na PI561356. Dentre os transcritos analisados por qPCR, o gene tiazol (Glyma 10g39740.1) é o único que foi ativado apenas nas plantas resistentes. Esse gene está envolvido na síntese de tiamina, que é conhecida por estar envolvida na resposta de defesa em plantas, por meio da indução da SAR (GOYER, 2010), sugerindo que a tiamina possa estar envolvida com a resistência em resposta a FAS na PI561356. Sendo assim, podemos sugerir o tiazol como candidato para estudos mais detalhados que possam verificar seu envolvimento com a resposta de resistência da soja ao *P. pachyrhizi*.

Conclusões

- A metodologia ACP é eficiente em identificar DEGs envolvidos na resposta de defesa.
- Análises de expressão relativa revelaram que as respostas iniciais são mais intensas nas plantas resistentes.
- Identificou-se o gene tiazol como candidato para futuros estudos para verificar seu envolvimento com a resposta de resistência da soja ao *P. pachyrhizi*.

Referências

GOYER, A. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. **Phytochemistry**, V.71, p.1615. 1624, 2010.

LINO, E.J. **Identificação e caracterização de transcritos relacionados a mecanismos de resistência à ferrugem asiática da soja**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MALDONADO, A.M.; DOERNER, P.; DIXONK, R.A.; LAMB, C. J. CAMERON, R.K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature**, v.419, p.399-403, 2002.

MORALES, A.M.A.P.; GRAHAM, M.; BORÉM, A.; ABDELNOOR, R.V. Advances on molecular studies of the interaction soybean . asian rust. **Croap Breeding and Applied Biotechnology**. 2012. No prelo.

NÜHSE, T.S.; BOTTRIL, A.R.; JONES, A.M.E.; PECK, S.C. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. **The Plant Journal**, v.51, p.931. 940, 2007.

VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J.C.; GRAHAM, M.A.; NETTLETON, D. DITTMAN, J.D.; NELSON, R.T.; GODOY, C.V.; ABDELNOOR, R.V.; ALMEIDA, Á.M. R.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **The American Phytopathological Society**, v.20, n.8, p.887. 899, 2007.

ZHOU, J.; TAN, X.; BRESSAN, R.A.; MARTIN, G.B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. **The EMBO Journal**, v.16, n.11, p.3207. 3218, 1997.