

PERFIL DE EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DE GENES HSFs EM SOJA

ANA MARINA PEDROLO¹; CÁSSIA STAFEN²; DANIEL DA ROSA FARIAS²,
ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA²; CAMILA PEGORARO³

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel – anapedrolo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel – cassiastafen@outlook.com; fariasdr@gmail.com
acostol@terra.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente expostas tanto a estresses bióticos como a abióticos, e estes podem ocorrer simultaneamente. Dentre os abióticos, podemos destacar o aumento da temperatura, que é um dos principais estresses que afetam a produtividade das culturas (MITTLER et al., 2006; WANG et al., 2003). De modo similar, a produtividade também é afetada negativamente pelo excesso de alumínio (Al) (SILVA et al., 2001). Além disso doenças causadas por fungos estão entre os principais fatores bióticos que limitam a produção de grãos (JULIATTI et al., 2004).

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é a principal leguminosa cultivada no Brasil e tem a doença ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) como um dos entraves para produção nacional (FAO, 2015), bem como fatores ambientais adversos (aumento da temperatura e o excesso de Al). Como as plantas não conseguem evitar a exposição a fatores bióticos e abióticos, evolutivamente elas desenvolveram adaptações morfológicas, fisiológicas ou moleculares que as auxiliam a minimizar os danos causados por esses fatores (AL-WHAIBI, 2010).

Foram identificados em plantas genes que são expressos em resposta a estresses, um exemplo são as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSPs), as quais estão associadas com respostas ao estresse por fatores abióticos (SUN et al., 2002). Recentemente essas proteínas também foram associadas em respostas a infecção por patógenos (PANTHEE et al., 2007). Após a percepção do estresse ocorrem diversos eventos moleculares na planta, os quais são iniciados pela ativação dos HSFs (*Heat Shock Factor* – HSF) (HSU et al., 2010), fatores de transcrição responsáveis por regular a transcrição das HSPs. Em soja foram identificados 38 genes da família HSF (LI et al., 2014), no entanto, a regulação e o perfil transcricional desses genes sob diferentes condições ambientais não são bem conhecidos.

Dessa forma esse trabalho teve por objetivo avaliar a regulação e o perfil transcricional de genes da família HSF de soja em condições de estresses biótico e abiótico.

2. METODOLOGIA

Trinta e oito genes da família HSF em soja (*Glycine max*) foram identificados a partir de uma lista previamente reportada por Li et al., (2014).

O perfil de expressão *in silico* foi obtido a partir do banco de dados de expressão gênica *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/gv/>) (ZIMMERMANN et al. 2008) através de dados obtidos em 3 diferentes

experimentos. Os dados de expressão utilizados foram provenientes do experimento 1: plântulas de soja da cultivar PI432612 (contendo gene *Rpp3* que confere resistência a isolados específicos de *Phakopsora pachyrhizi*) submetida ao estresse biótico por *P. pachyrhizi* HW94-1 (24, 144 e 288 horas pós infecção – hpi – em 20°C); experimento 2: plântulas de soja das cultivares PI416937 (tolerante ao Al) e Young (suscetível ao Al) foram submetidas ao estresse por $Al^{3+} + Mg^{2+}$ (pH 4,3; 10 μM Al^{3+} ; 50 μM Mg^{2+} por 72h); e experimento 3: plântulas da cultivar Williams 82 submetidas a 28°C por tempo necessário para redução da fotossíntese em 20 e 30%.

Apenas dados de expressão com p-value <0,001 foram utilizados nas análises. Dos 38 genes estudados, apenas 24 apresentavam dados de expressão no *Genevestigator*. Os dados foram exportados do e carregados no programa *MeV: MultiExperiment Viewer (TM4 MeV)* (SAEED et al., 2003).

A identificação de elementos *cis* na região promotora de cada gene foi feita utilizando o programa *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (LESCOT et al. 2002). Apenas elementos com *Matrix score* ≥ 5 foram considerados.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando plantas de soja foram submetidas ao estresse por *P. pachyrhizi* (Figura 1A) observou-se a indução da transcrição de seis genes *HSFs*, a qual ocorreu 144 h após a infecção. Esse comportamento sugere que os genes induzidos estão associados à resposta da planta frente ao estresse, sendo considerados alvos de estudos mais aprofundados.

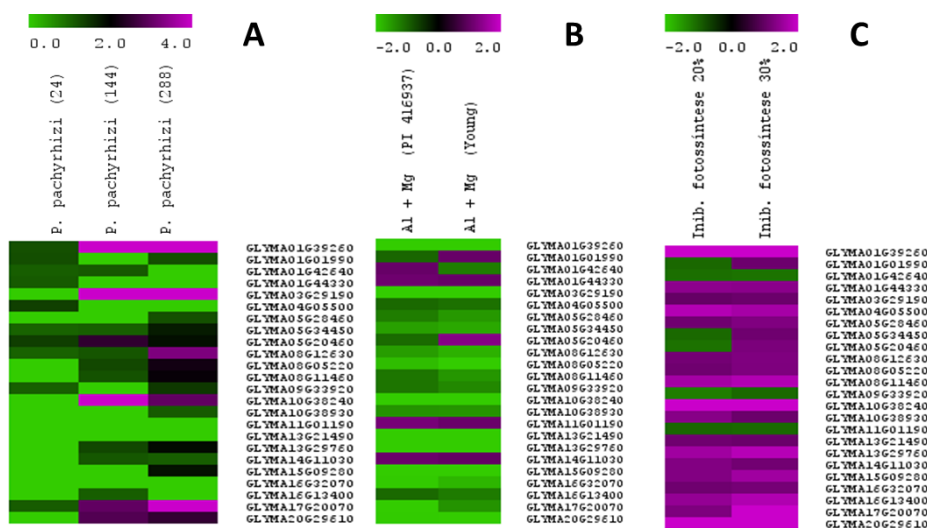


Figura 1. Perfil transcricional *in silico* de genes da família HSF em soja. A – Expressão gênica em plantas submetidas ao estresse por ferrugem. B – Expressão gênica em plantas submetidas ao estresse por Al + Mg. C – Expressão gênica em plantas submetidas ao estresse por calor

Em condições de estresse por Al + Mg verificou-se que a maioria dos genes responde de forma similar entre a cultivar suscetível (Young) e tolerante (PI416937) (Figura 1B). Perfil contrastante foi observado para os genes *Glyma01g01990* e *Glyma05g20460*, que foram induzidos apenas na cultivar

Young, e o gene *Glyma01g42640*, que foi induzido apenas na cultivar tolerante. Este resultado indica que os genes *Glyma01g01990* e *Glyma05g20460* estão associados à resposta da planta em condição de estresse, como mecanismo de defesa, e que o gene *Glyma01g42640* pode estar diretamente relacionado com o mecanismo de tolerância ao estresse por AI, tornando-o um potencial candidato para estudos de transformação genética visando a obtenção de plantas tolerantes a AI.

O aumento da temperatura levou a indução da maioria dos genes estudados (Figura 1C). Este resultado já era esperado, visto que a família gênica analisada está diretamente associada ao estresse por calor.

A regulação da transcrição pode ocorrer através da ligação de fatores de transcrição em elementos *cis* da região promotora dos genes (SAZEGARI et al., 2015), no entanto, esse mecanismo ainda não está completamente elucidado. Com base nos resultados obtidos foi possível observar que, para genes da família HSF, não há uma correlação entre número de elementos *cis* com o perfil transcricional (Figura 2). Assim, sugere-se que o número de elementos *cis* presente na região promotora de um gene não está associado com o número de estresses que esse gene será responsivo.

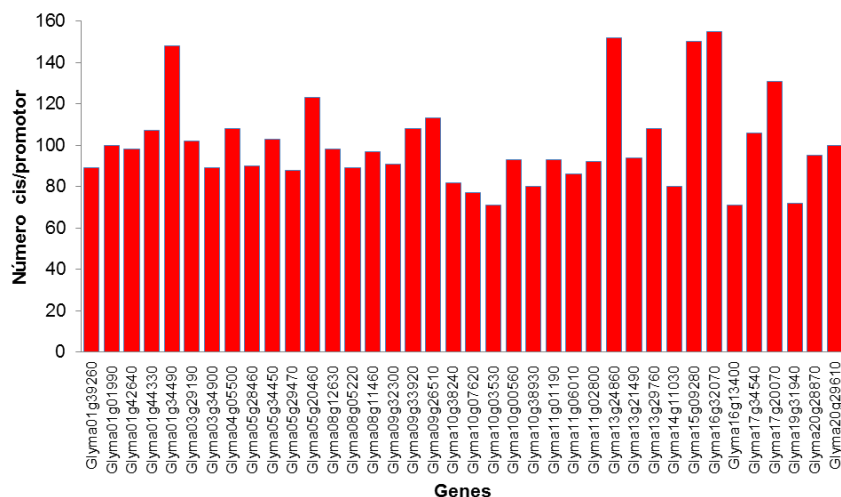


Figura 2. Número de elementos *cis* presentes na região promotora (1kb) de genes da família HSF em soja.

Nesse estudo observou-se uma grande diversidade de elementos *cis* entre os promotores analisados, e cada elemento apresenta ocorrência variada (dados não mostrados). Esse comportamento indica que a regulação gênica é dependente do tipo de elemento *cis* presente em cada promotor.

4. CONCLUSÕES

O gene *Glyma01g42640* é candidato para estudos de transformação genética visando à obtenção de plantas de soja tolerantes ao AI. Sugere-se que a regulação da transcrição de genes da família HSF em soja se dá em função do tipo de elemento *cis* presente na região promotora e não pelo número desses elementos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WHAIBI, MH. Plant heat-shock proteins: a mini review. **Journal of King Saud University (Science)**, v.23, n.1, p.139-150, 2010.
- FAO. **Perspectivas Agrícolas 2015-2024. Capítulo 2. Agricultura brasileira: Perspectivas e Desafios.** OCDE – FAO 2015. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf> Acessado em 17 julho 2016.
- HSU S.F.; LAI H.C.; JINN T.L. Cytosol-localized heat shock factor-binding protein, AtHSBP, functions as a negative regulator of heat shock response by translocation to the nucleus and is required for seed development in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.153, n.2, p.773-784, 2010.
- JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C.; BALARDIN, R.S.; VALE, F.X.R. Ferrugem da soja: epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.13, p.351-395, 2005.
- LI, P-S.; YU, T-F.; HE, G-H.; CHEN, M.; ZHOU, Y-B.; CHAI, S-H.; XU, Z-S.; MA, Y-Z. Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. **BMC Genomics**, v.15, p.1009, 2014.
- MITTLER R: Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v.11, n.1, p.15-19, 2006.
- PlantCARE**: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences.
- PANTHEE DR, YUAN JS, WRIGHT DL, MAROIS JJ, MAILHOT D, STEWART CN: Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Funct. Integr. Genomics**, v.7, n.4, p.291-301, 2007.
- SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, n. 2, p. 374-378. 2003.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p. 406-425, 1987.
- SILVA, I.R., SMYTH, T.J., ISRAEL, D.W., RUFTY, T.W. 2001a. Altered aluminum inhibition of soybean root elongation in the presence of magnesium. *Plant Soil*, v. 230, n.2, p.223–230, 2001.
- SUN W, MONTAGU MV, VERBRUGGEN N: Review: small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1577, p.1-9, 2002.
- WANG W, VINOCUR B, ALTMAN A: Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v.218 n.1, p.1–14, 2003.
- NCBI. Acessado em: 10-de Jul. de 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369686/>
- ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.; GRUISSEM, W. Genevestigator transcriptome meta-analysis and biomarker search using rice and barley gene expression. *Databases*. **Molecular Plant**, v.1, p.851-857, 2008.