

Análise funcional do gene At4g10250 em resposta à infecção por *Meloidogyne javanica* em *Arabidopsis thaliana*

SILVA, A.G.¹; HISHINUMA-SILVA, S.M.²; LOPES-CAITAR, V.S.²; NOMURA, R.G.²; DIAS, W.P.³; LOPES, I.O.N.³; CARVALHO, M.C.C.G.¹; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.³

¹UENP, Bandeirantes, PR, aline.uenp@hotmail.com; ² Universidade Estadual de Londrina;

³Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A soja é a principal oleaginosa cultivada no mundo, sendo o cultivar brasileiro que mais cresceu nas últimas três décadas (Juhász et al., 2013). Segundo dados da Conab (2018), o Brasil aumentou sua safra de soja em 74,8% nos últimos 10 anos, com aumento de área de 40,4% e produtividade de 24,5%. Na safra 2017/2018, a produtividade média da soja brasileira chegou a 3.333 kg/ha, 2,6% superior à safra anterior.

Como consequência da ampliação nacional dessa cultura, a impulsão da monocultura e a adoção de práticas inapropriadas no manejo, como por exemplo, a sequência de sucessões entre soja e milho que é feita na região tropical do Brasil, a qual apresenta condições como umidade e temperatura favoráveis à reprodução e alimentação de nematoides, têm implicado em aumento das populações de nematoides como os de galhas *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* (Dias et al., 2017). O fitonematoide *M. javanica* merece destaque pois exibe ampla distribuição geográfica, além de apresentar hábito alimentar polífago (Santini, 2014). Segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia (2016), os nematoides acabam comprometendo o sistema radicular da planta, podendo levar a uma perda de produtividade de 30% a 100%, ou até 10,6% da soja mundial (Silva et al., 2006). Tais perdas podem ser muito maiores, dependendo das condições edafoclimáticas e da variedade utilizada.

Por outro lado, as plantas, podem resistir a ataques de patógenos pela ativação de uma larga variedade de mecanismos de defesa. Dentre esses mecanismos, a ação de proteínas choque térmico (HSP) tem sido descrita (Castro et al., 2013). Essas proteínas (HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e HSP20)

são agrupadas com base em seu tamanho e homologia e tem como função principal atuar como chaperonas moleculares (Freitas et al., 2012).

A expressão das proteínas HSP20 é induzida em resposta ao estresse de calor, mas também já foi identificada a participação dessas proteínas associadas a outros estímulos abióticos, como o déficit de água, metais pesados, ozônio e radiação UV (Barcala et al., 2008) in the roots of infected plants, the differentiation of special feeding cells with high metabolic activity (syncytia and giant cells, respectively, bem como sob estímulos bióticos, como a infecção por patógenos como os nematoides (Escobar et al., 2003; Kandoth et al., 2011).

Com base neste conhecimento, Lopes-Caitar et al. (2013) identificaram *in silico* os membros da família dos genes *GmHsp20* em soja, bem como caracterizaram a de expressão *in vivo* destes membros sob diferentes estresses bióticos e abióticos. Como resultado, seis genes HSP20 induzidos apenas no genótipo de soja resistente ao *M. javanica* foram identificados, dentre os quais o gene *GmHsp22.4*, apresentou elevada indução de sua expressão, em torno de 60 vezes maior, quando inoculado com esse nematoide.

O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito da inserção de T-DNA nas regiões promotora e codificadora do gene ortólogo *GmHsp22.4* em *A. thaliana* (*At4g10250*), sob a infecção pelo nematoide *M. javanica*, visando caracterizar funcionalmente o efeito direto desta chaperona frente à infecção a este fitonematoide.

Material e Métodos

Material biológico

O experimento foi conduzido na Embrapa Soja, em Londrina, PR, durante os meses de janeiro a abril de 2018. Para analisar o efeito das mutações no gene *At4g10250*, foram utilizadas sementes transformadas de *A. thaliana*, obtidas do banco de dados “The Arabidopsis Information Resource” (TAIR, 2018), com duas diferentes linhas de inserção de T-DNA, sendo uma na região promotora (WiscDsLox489-492E13) e outra na codificadora (Gabi_265F12), com mutações que levam a perda de função do fragmento.

Para a instalação do experimento, as sementes foram previamente multiplicadas até a obtenção da quantidade necessária, sendo a confirmação da homozigose dos diferentes eventos confirmada por PCR.

Preparo do inóculo

A população de *M. javanica* foi multiplicada na casa de vegetação do Setor de Nematologia da Embrapa Soja, em plantas de soja do genótipo suscetível Doko RC por aproximadamente 90 dias. As raízes das plantas infectadas foram processadas de acordo com a técnica de Coolen e D'Herde (1972), lavadas, cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador, para extração dos nematoides. Posteriormente, as amostras foram passadas em peneiras de 200 e 500 meshes e, após enxágue com água corrente, o conteúdo retido na peneira de 500 meshes foi recuperado em beakers e disposto em câmara de eclosão por 6 dias. Após esse período, os indivíduos viáveis foram recuperados e o material obtido foi quantificado em câmara de Peters, utilizando 1mL da suspensão para a projeção do número total de indivíduos. O inóculo foi ajustado para aproximadamente 400 indivíduos.mL⁻¹.

Bioensaio com nematoides

O experimento com plantas de *A. thaliana* transformadas seguiu o delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições para cada construção, visando a comparação entre os genótipos selvagem (WT) e 2 eventos de transformação (mutação na região codificadora-GABI e mutação na região promotora-WISC). No total, foram utilizados 60 copos plásticos de 200mL contendo areia autoclavada e enriquecida com solução nutritiva, sendo uma planta por copo.

A inoculação de cada planta foi feita através de pipetagem de 1mL de juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. javanica* junto às raízes, através de um pequeno orifício aberto ao lado da raiz da planta, totalizando aproximadamente 400 nematoides/planta.

A temperatura utilizada foi adaptada para favorecer tanto a planta como os nematoides. Desta forma, as plantas de *A. thaliana* foram cultivadas em câmara fitotron à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 8 horas de luz e 16

horas no escuro, a fim de se estender seu ciclo possibilitando a conclusão do ciclo dos nematoides.

Caracterização morfológica dos eventos de *A. thaliana*

Após 45 dias de plantio, foi realizada a coleta do tecido radicular das plantas de *A. thaliana*. Foram avaliados os parâmetros peso e comprimento da raiz, número de folhas e peso da parte aérea, a fim de se avaliar a influência das inserções na morfologia das plantas.

Avaliação dos nematoides

Foi realizada a contagem das fêmeas adultas localizadas nas raízes, após a coloração com a fucsina ácida (Taylor; Sasser, 1978), e número total de ovos e nematoides (Coolen; D'Herde, 1972), após os 45 dias de inoculação. Todos os parâmetros avaliados foram comparados entre as plantas WT e os eventos de transformação (GABI e WISC). Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Resultados e Discussão

Os comprimentos da raiz da mutação na região promotora e codificadora foram de aproximadamente 11,0 cm, igualmente observada na selvagem (Figura 1A). A mesma característica foi encontrada quando se avaliou o peso da raiz, sendo que, para o evento com a alteração na região promotor e na codificadora, os valores obtidos foram de 0,8353 g e 0,9382 g, respectivamente (Figura 1B). Já para o evento controle o peso da raiz foi de 0,9764 g, não apresentando diferença significativa (Figura 1B).

Em relação ao parâmetro número de folhas e peso da parte aérea, os valores também não apresentaram diferença significativa (Figura 1C e D). Desta forma, os resultados obtidos permitiram observar que, em ambas as mutações, não foi possível identificar diferenças significativas no desenvolvimento das plantas, quando comparada à planta selvagem.

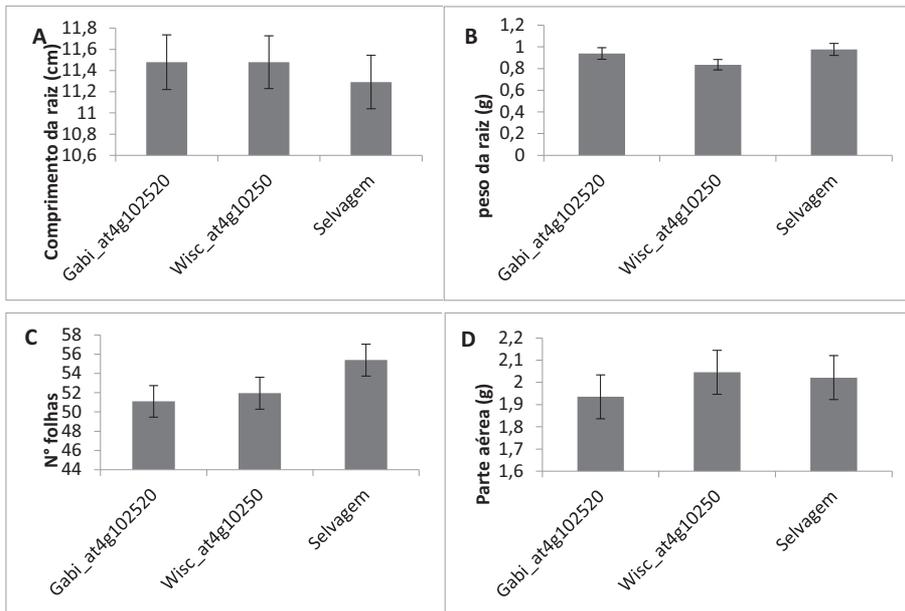


Figura 1. Caracterização morfológica da *A. thaliana* exibindo a alteração na região codificadora e promotora do gene *At4g10250* e o controle selvagem (n=20). (A) Comprimento da raiz em cm. (B) Peso da raiz em g. (C) Número de folhas. (D) Peso da parte aérea. Média de 20 repetições \pm erro padrão da média.

O efeito da inserção de T-DNA na região promotora e codificadora do gene *At4g10250*, sob a infecção do nematoide de galha, foi examinada pela contagem do número de fêmeas e número de ovos e juvenis. A média do número de fêmeas em GABI foi de 24,6155, e para o evento WISC foi de 26,5143 significativamente maiores que no controle selvagem, que foi de 10,0388 (Figura 2A). De maneira semelhante, na contagem do número de ovos e juvenis, verificou-se um aumento apenas nas plantas de *A. thaliana* mutantes, com o valor de 2.631,15 para a região codificadora e 1.636,29 para a região promotora, enquanto para o controle, o valor foi de 964,686.

Com base nos resultados, pode se concluir que a mutação na região codificadora acentuou o número de ovos/juvenis encontrados, apresentando uma significância estatística de 5%, quando comparado a selvagem. Já o efeito da mutação na região promotora pode ser observada apenas ao nível de significância de 10%, no que se refere ao número de ovos e juvenis, em comparação com as selvagens. Esses dados demonstram que ambas as

regiões, quando mutadas, têm um maior parasitismo e desenvolvimento de nematoides.

Mais estudos são necessários, a fim de se averiguar a relação desse gene com a infecção e multiplicação dos nematoides, na tentativa de confirmar assim, a condição de um estresse biótico ocasionado pelo nematoide.

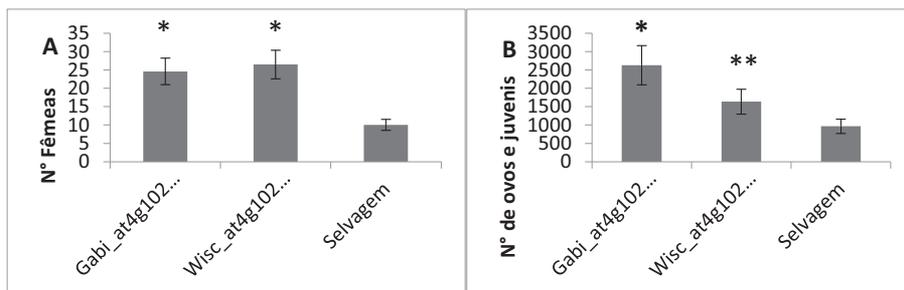


Figura 2. Caracterização fenotípica da *A. thaliana* exibindo a alteração na região codificadora e promotora do gene *At4g10250* e o controle selvagem (n=20). Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média. * indica significância estatística ao nível de 5% em comparação com o WT e ** indica significância estatística ao nível de 10% em comparação com o WT.

Conclusão

Não há alteração morfológica entre os mutantes e o controle selvagem sob infecção do nematoide *M. javanica*, mostrando que as mutações, tanto na região promotora quanto na região codificadora do gene *At4g10250*, não exercem influência no desenvolvimento das plantas. Entretanto, ambas as mutações têm efeito direto na infecção e multiplicação dos nematoides.

Referências

BARCALA, M.; GARCÍA, A.; CUBAS, P.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J.; FENOLL, C.; ESCOBAR, C. Distinct heat-shock element arrangements that mediate the heat shock, but not the late-embryogenesis induction of small heat-shock proteins, correlate with promoter activation in root-knot nematode feeding cells. **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 151-164, 2008.

CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREIDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de choque térmico hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, v. 5, safra 2017/18, n. 9, nono levantamento, jun.2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/20861_fb79e3ca2b3184543c580cd4a4aa402b>. Acesso em: 18 jun. 2018.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Center, 1972. 77 p.

DIAS, W. P.; MORAES, L. A. C.; CARVALHO, C. G. P.; ORSINI, I. P.; LEITE, R. M. V. B. de C. **Sucessão soja/girassol como opção de manejo em áreas infestadas com nematoides de galha e das lesões radiculares**. Londrina: Embrapa Soja, 2017. 7 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 135).

ESCOBAR, C.; BARCALA, M.; PORTILLO, M.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J.; FENOLL, C. Induction of the Hahsp17.7G4 promoter by root-knot nematodes: involvement of heat-shock elements in promoter activity in giant cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 12, p. 1062-1068, 2003.

FREITAS, W. E. de S.; FERNANDES, P. L.; LEITE, G. A.; DANTAS, J. I. A.; PONTES, C. A.; CARVALHO, C. A. C. Ação das proteínas de choque térmico em frutos. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 4, p. 1-6, 2012.

JUHÁSZ, A. C. P.; PÁDUA, G. P.; WRUCK, D. S. M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N. R. Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Informe Agropecuário**, v. 34, n. 276, p. 66-75, 2013.

KANDOTH, P. K.; ITHAL, N.; RECKNOR, J.; MAIER, T.; NETTLETON, D.; BAUM, T. J.; MITCHUM, M. G. The soybean Rh1 locus for resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* regulates expression of a large number of stress-and defense-related genes in degenerating feeding cells. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1960-1975, 2011.

LOPES-CAITAR, V. S.; CARVALHO, M. C. C. G.; DARBEN, L. M.; KUWAHARA, M. K.; NEPOMUCENO, A. L.; DIAS, W.P.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses **BMC Genomics**, v. 14, n. 577, 2013. 17 p.

SANTINI, L. **Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas**. 2014.118 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVA, J. F. V. da; DIAS, W. P.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. de S. Perdas por nematoides chegam a 10,6% da soja mundial. **Visão Agrícola**, v. 3, n. 5, p. 103-107, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA. **Fernando Baida dá o recado em Dia de Campo**. SBN, 2016. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/tag/nematoides-em-soja>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

TAIR. **The Arabidopsis Information Resource**. Disponível em: <<https://www.arabidopsis.org>>. Acesso em: 12 jun. de 2018.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: International Meloidogyne Project, NCSU & USAID Coop. Publ., 1978. 111p.