

## **Estudos *in vivo* do papel de inserções AT<sup>(n)</sup> da região promotora do gene Gmhsp17.6-L na regulação de genes em soja**

---

LOPES, V.S.<sup>1</sup>; FUGANTI, R.<sup>2</sup>; BARBOSA, J.F.<sup>2</sup>; De CARVALHO, M.C.C.G.<sup>3</sup>; MARIN, S.R.R.<sup>4</sup>; SILVA, J.F.V.<sup>4</sup>; NEPOMUCENO, A.L.<sup>4</sup>; MARCELINO, F.C.<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL, valopes@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup>Bolsista CNPq; <sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista - UNESP; <sup>4</sup>Embrapa Soja

Eleito o segundo maior produtor mundial de soja na safra 2007/08, o Brasil totalizou uma produção de 59,50 milhões de toneladas, superando em 1,9 % a produção da safra anterior, de 58.3 milhões de toneladas, participando com 40,73 % do total de grãos produzidos no país (Conab, 2008).

Devido a tal importância, os níveis de produtividade podem e devem ser aprimorados, por meio de estratégias para enfrentar os fatores externos aos quais estão submetidas as plantas. Tais condições ambientais adversas causam estresses que afetam, de modo adverso, o crescimento, desenvolvimento ou a produtividade. Esses fatores, bióticos e/ou abióticos, atuando juntos ou isoladamente, fazem com que as condições ideais de cultivo dificilmente sejam atingidas (Bonato, 2000).

Dentre esses fatores, as doenças provocadas por fitopatógenos, que infectam plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, têm provocado a queda na produtividade da soja (Bonato, 2000). No Brasil, principalmente as espécies de *Meloidogyne javanica* e *M. incógnita*, formadoras de galhas nas raízes, representam sério problema para a produção em diversas regiões, incluindo o sudoeste e o norte do Paraná.

A obtenção de cultivares resistentes tem se mostrado a melhor, mais substancial e econômica estratégia de controle desses fitopatógenos. Com

o advento da biotecnologia e o surgimento de novas metodologias para auxiliar no Melhoramento Genético, a obtenção de genótipos desejados em menos tempo tornou-se uma possibilidade executável (Souza, 2001).

Em trabalhos anteriores, estudando populações resultantes de cruzamentos entre a cultivar de soja PI595099, resistente ao nematóide de galhas *M. javanica*, e o genótipo suscetível BRS133, linhagens resistentes e suscetíveis foram obtidas (Silva et al., 2001). Da população F<sub>3</sub>, 25 linhagens altamente resistentes e 26 com elevada suscetibilidade ao patógeno foram selecionadas e utilizadas para estudos com marcadores moleculares microssatélites, objetivando-se obter marcadores para seleção assistida de genótipos de soja resistente ao *M. javanica* (Fuganti et al., 2004).

Apenas em indivíduos suscetíveis ao nematóide de galhas, um marcador microssatélite, SOYHSP 176, foi detectado. O fragmento gerado por SOYHSP 17 foi sequenciado e mostrou 100 % de similaridade com a região promotora de uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular (*Gmhsp17.6-L*), encontrada na soja, e cuja sequência está depositada no *GenBank* (nº de acesso: M11317). O sequenciamento completo do gene revelou que a única diferença entre indivíduos resistentes e suscetíveis estava na região promotora do gene, com os indivíduos resistentes apresentando inserções AT<sub>(n)</sub> maiores que nos indivíduos suscetíveis (Fuganti et al., 2008). Ainda, ensaios de PCR quantitativo foram conduzidos, o que permitiu concluir que o nível de expressão do gene era superior nos indivíduos resistentes inoculados, quando comparados com os suscetíveis (Fuganti et al., 2008).

De acordo com a literatura, essas regiões AT<sub>(n)</sub>, dentro da região promotora dos genes, são responsáveis por facilitarem o acesso da RNA polimerase ao sítio de início de transcrição, por excluïrem histonas e, ainda, por permitirem a ligação de proteínas e fatores de transcrição responsáveis pela ativação e indução da transcrição desses genes (Fuganti et al., 2008).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho é confirmar *in vivo*, o papel das inserções AT<sub>(n)</sub>, presentes na região promotora do gene *Gmhsp17.6-L*, na regulação da expressão gênica em soja. Para tal, cassetes de expressão, contendo a região promotora do gene *Gmhsp17.6-L*, com diferentes tamanhos de inserções AT<sub>(n)</sub>, oriunda de indivíduos resistentes e suscetíveis da população, serão clonados “in frame” com as regiões codificadoras do gene *GUS/GFP* (*reporters*) e do gene *AHAS*. Tais construções serão utilizadas em estudos *in vivo*, por meio de transformações da cultivar BRS 133, suscetível, via biobalística. Futuramente, o nível de expressão do gene *AHAS* e da proteína *GUS* nas plantas transgênicas serão monitorados sob indução com estresses abióticos (frio, calor e salinidade) e bióticos (nematóide), em ensaios de PCR quantitativo e histoquímico, respectivamente.

Para a construção dos cassetes, o DNA genômico foi extraído e os fragmentos das regiões promotoras foram amplificados com os pares de *primers* pSoyHspA1el\_F e pSoyHspNcoI\_R desenhados a partir da sequência completa do gene *Gmhsp17.6-L* disponível no *GenBank* (número de acesso: M11317), acrescidos dos sítios de enzimas de restrição visando a direcionar a entrada dos fragmentos no processo de clonagem no plasmídeo pAC321 (C1). A estratégia delineada foi a retirada do promotor do gene (*ahas 5*), pela ação das enzimas de restrição *A1el* e *NcoI* e a inserção dos fragmentos dos promotores dos materiais a serem testados. O segundo cassete (C2) será construído utilizando-se o plasmídeo de destino pHGWFS7 (Karimi et al., 2002), que permite a clonagem de fragmentos de interesse, a partir do vetor de entrada pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>, utilizando os sítios de recombinação AttL/AttR e a enzima LR clonase. Os fragmentos de interesse são clonados “in frame” com as regiões codificadoras dos genes *GUS/GFP*, permitindo verificar a resposta de regiões regulatórias pela medida da expressão dos genes repórteres. A confirmação da clonagem será feita por PCR e reações de restrição, e a direção de ligação dos fragmentos por sequenciamento.

Após obtenção dos vetores, os mesmos serão utilizados para transformação de embriões de soja da cultivar BRS 133, suscetível ao

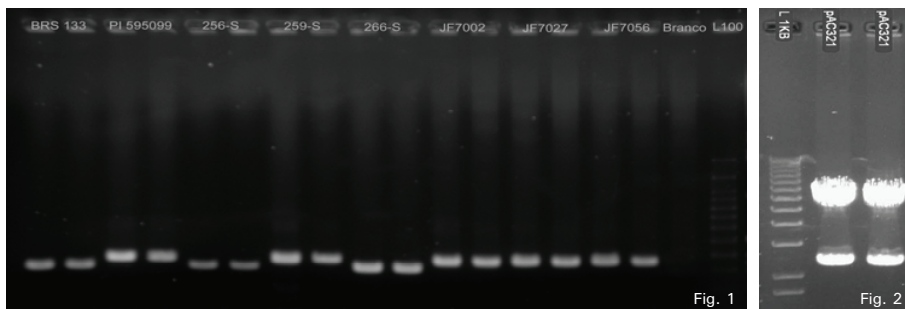
nematóide, pela técnica de biobalística. Uma vez confirmada a obtenção das plantas transgênicas, as mesmas serão desafiadas com estresses abióticos (frio, calor e salinidade) e bióticos (nematóide), a fim de testar o papel do promotor na resposta a esses estresses.

De acordo com os resultados parciais obtidos, as ampliações das regiões promotoras do gene *Gmhsp17.6-L* (Fig. 1) oriundo dos DNAs extraídos das oito diferentes cultivares de soja, ou seja, dos indivíduos resistentes (JF7002, JF7027 e JF7056) e suscetíveis (256-S, 259-S e 266-S), permitiram a obtenção dos fragmentos esperados de tamanhos entre 300 e 400 pb.

A linearização do plasmídeo pAC321, por ação das enzimas *AelI* e *NcoI*, para sua utilização na C1, apresentou bandas no gel de eletroforese (Fig. 2) de 6.180pb e 2.416pb, as quais correspondem respectivamente, ao plasmídeo base da C1, contendo a região codificadora do gene *Ahas* e o promotor de não interesse.

As próximas etapas do trabalho para obtenção de C1 e C2 serão a ligação das regiões promotoras aos respectivos plasmídeos, a clonagem das construções em células eletrocompetentes de cepas DH5 -  $\alpha$  (*E. coli*), a extração do DNA plasmidial para análises por PCR e reações de restrição e a confirmação da direção dos fragmentos por sequenciamento.

Espera-se que essas análises possam complementar os dados já obtidos em estudos anteriores sobre o papel do gene *Gmhsp17.6-L* na resposta de resistência ao nematóide *M. javanica* e, principalmente, determinar a função das inserções AT<sub>(n)</sub> presentes na região promotora deste gene na regulação de sua expressão. Futuramente, caso se confirme *in vivo* a capacidade de induzir a expressão gênica diferenciada de outros genes, tais promotores poderão ser utilizados em novas estratégias moleculares para controlar a expressão de genes.



**Fig. 1.** Amplificações da região promotora do gene Gmhsp17.6-L, com os primers pSoyHspAleI\_F e pSoyHspNcoI\_R. Ladder 100 pb.

**Fig. 2.** Restrição com as enzimas AleI e NcoI do plasmídeo pAC321. Ladder de 1kb.

## Referências

BONATO, E. R. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p.254, 2000.

CONAB- **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <www.conab.gov.br>, Acesso em: 16, jun., 2008.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Identificação de Marcadores Moleculares de Microsatélites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p.125-130, 2004.

FUGANTI, R. **Análise da região promotora do gene Gmhsp 17.6-L em genótipos de soja resistentes e susceptíveis ao nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica***. 2008,124f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

KARIMI, M., INZE, D., DEPICKER, A., Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends Plant Science**, v.7, n.5, p.193-195, 2002.

SILVA, J. F. V.; FERAZ, L. C. C. B. & ARIAS, C. A. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. **Nematropica**. v.31, p.211-219, 2001.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. F. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento. Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.939-965.