

**CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MEMBRANAS DE MACROARRANJO DE
DNA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO
PLANTA-NEMATÓIDE**

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 204

CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE MEMBRANAS DE MACROARRANJO DE DNA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATÓIDE

Rosângela Vieira de Andrade
Ângela Mehta
Patrícia Messemberg Guimarães
Felipe Rodrigues da Silva
Maria de Fátima Grossi de Sá
Mário Alfredo de Passos Saraiva
Rodrigo Fragoso
Ana Cristina Miranda Brasileiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

C 758 Construção e validação de membranas de macroarranjo de DNA para o estudo da interação planta-nematóide / Rosângela Vieira de Andrade ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
10 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 204).

1. Algodão - *Gossypium hirsutum*. 2. Amendoim silvestre - *Arachis stenosperma*. 3. Feijão-caupi - *Vigna unguiculata*. 4. DNA - Membranas de macroarranjo . 5. Nematóide - *Meloidogyne incognita*. I. Andrade, Rosângela Vieira de. II. Série.

631.5233 - CDD 21.

CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DE MEMBRANAS DE MACROARRANJO DE DNA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATÓIDE

Rosângela Vieira de Andrade¹

Ângela Mehta²

Patrícia Messemberg Guimarães²

Felipe Rodrigues da Silva³

Maria de Fátima Grossi de Sá³

Mário Alfredo de Passos Saraiva⁴

Rodrigo Fragoso⁵

Ana Cristina Miranda Brasileiro⁶

Resumo

O desenvolvimento de tecnologias de seqüenciamento em larga escala resultou em um grande volume de informações sobre seqüências completas, ou pedaços de seqüências expressas (ESTs), para os mais diversos organismos. O acúmulo destas informações aumentou consideravelmente a demandada por metodologias capazes de analisar simultaneamente um grande número de seqüências permitindo, desta forma, o estudo de padrões de expressão gênica em diferentes condições biológicas. Neste contexto, técnicas como a de arranjo de DNA tornaram-se necessárias na identificação de um grande número de genes diferencialmente expressos. Assim, o objetivo deste trabalho consiste na construção e validação de quatro membranas de macroarranjo de DNA para três espécies vegetais: algodão (*Gossypium hirsutum*); amendoim silvestre (*Arachis stenosperma*); feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e para uma espécie de nematóide (*Meloidogyne incognita*). Com este propósito, foram selecionadas 9.484 seqüências oriundas de 2 bibliotecas subtrativas de algodão e feijão-caupi resistentes e susceptíveis a *M. incognita*; 2 bibliotecas de cDNA de planta amendoim silvestre inoculadas e não-inoculadas com *M. arenaria* e uma biblioteca de cDNA da fase juvenil 2 de *M. incognita*, as quais foram impressas em membranas de náilon. As membranas validadas por hibridização com sondas *Overglo* serão oportunamente utilizadas na análise comparativa da expressão diferencial desses clones em hibridização com sondas homólogas ou heterólogas de diferentes estágios de infecção por *Meloidogyne* spp. e em diferentes hospedeiros, incluindo também hospedeiros não contemplados nesse estudo como soja, hortaliças, cana-de-açúcar, feijão-comum e fumo.

¹ Bióloga, PhD, Bolsista CNPq - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Eng. Agr.. PhD, Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Biólogo, PhD, Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Eng. Agr., Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Biólogo, PhD, Pesquisador, Embrapa Cerrados

⁶ Eng. Flor.. PhD, Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abstract

The development of DNA sequencing technologies resulted in a great volume of information about complete sequences of genes, or expressed sequence tags (ESTs), for a wide diversity of organisms. The accumulation of these data increased the demand for methodologies capable to analyze simultaneously a big number of sequences allowing the study of gene expression patterns in different biological conditions. In this context, high-throughput technologies like DNA arrays began essential in the identification of genes differentially expressed. The aim of this work consists of the construction and validation of four DNA macroarrays membranes for three species of plants: cotton (*Gossypium hirsutum*); wild peanut (*Arachis stenosperma*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) and for one specie of nematode (*Meloidogyne incognita*). In this purpose, 9.484 sequences were selected from two subtractive libraries of cotton and cowpea resistant and susceptible to *M. incognita* infection and from two cDNA libraries of wild peanut inoculated or not with *M. arenaria* and from one cDNA library of *M. incognita* juvenile phase 2. These sequences were spotted in nylon membranes and validated by hybridization with *Overgo* probes. Further comparative analysis of clones differentially expressed in this membrane will be performed by its hybridization with homologous or heterologous probes from different stages of infection by *Meloidogyne* spp. and not studied here hosts, including soybean, sugar cane, common beans and tobacco.

Introdução

A meloidoginose é a patogenia resultante da interação nematóide/raiz vegetal que provoca a formação de galhas radiculares, reduzindo drasticamente a produção vegetal e causando a morte das plantas nos estágios mais crônicos da infecção (MOURA, 1997). Os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) têm sido considerados os mais importantes na agricultura mundial por sua ampla disseminação e alta capacidade destrutiva (CAMPOS, 1997), causando perdas de mais de US\$100 bilhões por ano (WILLIAMSON e KUMAR, 2006). Mais de 2000 espécies de plantas são parasitadas por nematóides das galhas, principalmente espécies tropicais (SASSER, 1980; HUANG et al., 2006). No Brasil, as espécies do gênero *Meloidogyne* (principalmente *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*) são responsáveis por uma limitação substancial da produtividade de várias culturas como café, algodão, cana-de-açúcar, soja, feijão, fumo, hortaliças, frutíferas e olerícolas (CARNEIRO et al., 1996; 2000). O prejuízo causado no agronegócio brasileiro por nematóides vai muito além das perdas diretas, já que seu controle é realizado, atualmente, por rotação de culturas menos rentáveis e, principalmente, pelo uso de nematicidas que oneram significativamente a produção (CARNEIRO et al., 2000). Além disso, os modernos nematicidas não apresentam, em geral, um controle efetivo e ainda causam graves prejuízos ambientais e sociais já que apresentam alta toxicidade a humanos e seus resíduos, altamente estáveis, contaminam o solo e mananciais hídricos por tempo indeterminado (HAGUE e GOWEN, 1987; HUANG et al., 2006). Adiciona-se a esses problemas, a persistência dos patógenos no solo e o amplo círculo de plantas hospedeiras. Estes fatores obrigam novos enfoques no controle de nematóides fitoparasitas. Desta forma, a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) vem investindo ao longo dos últimos anos em pesquisas que objetivam um melhor entendimento da interação planta-nematóide e na prospecção de genes de resistência em germoplasmas silvestres, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes e sua aplicação em programas integrados de controle de fitonematóides para culturas de importância econômica para o País.

Dentro dessa iniciativa, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem utilizando ferramentas de genômica funcional (transcriptoma e proteoma) para identificar, isolar e caracterizar genes associados a mecanismos de fitopatogenicidade e resistência durante a interação hospedeiro-nematóide. Genótipos contrastantes (resistentes e susceptíveis) de café (*Coffea arabica*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e amendoim selvagem (*Arachis stenosperma*) foram submetidos à infecção, respectivamente, pelos nematóides: *Meloidogyne paranaensis*, *M. incognita*, *M. incognita* e *M. arenaria*, para a construção de biblioteca de cDNAs, identificação de RGAs (*Resistance Gene Analogs*) e análises de ESTs. Os genótipos contrastantes também vêm sendo utilizados na análise proteômica pelas técnicas de eletroforese bi-dimensional (2-DE) e espectrometria de massa. A identificação de genes expressos pelo patógeno, durante o processo de infecção, e pela planta

hospedeira, em resposta ao patógeno, é um dos passos críticos que levam a elucidação dos mecanismos de defesa das plantas.

A disponibilidade das bibliotecas de cDNA geradas em projetos de seqüenciamento de transcriptomas, juntamente com a robótica de alta precisão e o depósito de pequenas amostras de DNA em superfície sólidas, tornou possível a preparação de arranjos constituídos por um grande número de genes. Diante do acúmulo de informações geradas, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para análise em larga escala desde dados e visando principalmente, identificar genes diferencialmente expressos envolvidos em diversos processos biológicos (DONSON et al., 2002). Entre estas metodologias, destaca-se a de arranjo de DNA como uma ferramenta de abordagem rápida e precisa de análise da expressão gênica diferencial. Esta tecnologia permite a obtenção de um *fingerprint* (impressão digital) molecular da expressão de vários genes simultaneamente (JORDAN, 1998; GROUSE et al., 2001). Assim, genes que são expressos de forma coordenada em um tipo celular particular (fase específica) ou genes expressos durante determinada condição biológica (de crescimento; diferentes temperaturas; processos patológicos, etc.) ou genes expressos diferencialmente entre diferentes populações podem ser analisados de maneira eficiente por esta metodologia (KUDOH et al., 2000; GROUSE et al., 2001).

Existem várias opções metodológicas de arranjos para avaliar o perfil de expressão gênica. Uma destas opções é o estudo comparativo de expressão interespecie ou intergênero, por arranjo de DNA (conhecido como comparação *cross-species*), e foi inicialmente desenvolvido em mamíferos. A comparação *cross-species* baseada no uso de um arranjo de DNA desenvolvido para uma determinada espécie para analisar a expressão gênica de uma outra espécie, que será usada como sonda, e assim o arranjo de DNA é utilizado de uma maneira heteróloga. Assim, o objetivo deste trabalho consiste na construção e validação de quatro membranas de macroarranjo de DNA para três espécies vegetais: algodão (*Gossypium hirsutum*); amendoim silvestre (*Arachis stenosperma*); feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e para uma espécie de nematóide (*Meloidogyne incognita*). Essas membranas serão oportunamente utilizadas na análise comparativa da expressão diferencial desses clones em hibridização com sondas homólogas ou heterólogas de diferentes estágios de infecção por *Meloidogyne* spp. e em diferentes hospedeiros, incluindo também hospedeiros não contemplados nesse estudo como soja, hortaliças, cana-de-açúcar, feijão-comum e fumo.

Resultados e discussão

1. Clones depositados nas membranas:

Das bibliotecas de cDNAs construídas (subtrativas ou não) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a partir de raízes dos 3 hospedeiros (algodão, feijão-caupi e amendoim silvestre) inoculadas com os respectivos fitonematóides e da biblioteca da fase juvenil 2 de *Meloidogyne incognita*, um total de 9.484 seqüências ESTs foram selecionadas para impressão em membranas de macroarranjo, sendo: 1) Algodão (*Gossypium hirsutum*): 282 Unigenes

provenientes de duas bibliotecas subtrativas de genótipos contrastantes (resistente e suscetível) inoculados com *M. incognita*; 2) Feijão-caupi (*Vigna unguiculata*): 248 Unigenes selecionados em duas bibliotecas subtrativas para genótipos contrastantes (resistente e suscetível) inoculadas com *M. incognita*; 3) Amendoim silvestre (*Arachis stenosperma*): 6.930 clones oriundos de duas bibliotecas de cDNA de plantas resistentes inoculadas e não-inoculadas com *M. arenaria* e; 4) Nematóide: 2.024 clones provenientes de uma biblioteca de cDNA da fase juvenil 2 (infectiva) de *M. incognita*.

2. Extração e normalização dos plasmídios a serem depositados na membrana

Todo o conjunto dos clones bacterianos correspondendo as 9.484 seqüências selecionadas foi inoculado e crescido em placas *deep well* de fundo em “U” contendo 1 mL de meio SOC acrescido de 100 µg/mL de ampicilina a 37°C, sob agitação durante 22 horas. Um volume de 100 µL de cada inóculo foi transferido para as mesmas posições em outras placas e estocados em glicerol 35% (v/v) a -80°C. Os 900 µL restantes de cada cultura foram centrifugados a 4000xg durante 6 minutos a temperatura ambiente. Essas células foram ressuspensas e transferidas para placas tipo ELISA de 96 poços gerando um total de 98 placas.

O DNA plasmidial de todos os clones foi então extraído em larga escala de acordo com protocolo padrão descrito pelo fabricante e visualizado em gel de agarose 1% (Figura 1). Para cada gel, a amostra menos concentrada foi considerada como padrão e todas as demais amostras foram comparadas qualitativamente (análise visual) em relação à concentração desta amostra-padrão. As amostras consideradas mais concentradas, quando comparadas ao padrão, foram então diluídas em água, não ultrapassando o volume final de 40µL, atingindo desta forma uma concentração próxima ao padrão, na tentativa de normalizar a concentração de todas as amostras.

3. Construção da membrana de macroarranjo

Após a extração do DNA plasmidial 20 µL foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, onde foi adicionado 1 volume de DMSO em cada amostra, as mesmas foram transferidas de 98 placas de 96 poços para 25 placas 384 (Genetix). Em cada extremidade (posições A1, A12, P1 e H12) das placas 384 foi adicionado o gene constitutivo que codifica para actina de algodão, o qual foi usado como controle positivo. Além da actina, nas membranas de feijão-caupi e nematóide os genes da cromatina de feijão-caupi e o gene correspondente a proteína ribossomal L22 de *Caenorhabditis elegans* foram utilizados respectivamente, nas posições A2, P3. Em relação ao controle positivo para a hibridização *Overgo* (sonda plasmidial), o plasmídio P-GEM presente em todos os clones de todas as bibliotecas foi adicionado nas posições A2 e P2 de cada placa 384.

Todos os 9.484 clones das bibliotecas de cDNA foram depositados de maneira automatizada utilizando o robô Q-BOT (Genetix) em membrana de náilon Hybond N+ (GE), de acordo com instruções do fabricante. Após depósito, os plasmídios foram desnaturados em solução 0,4 N

NaOH e fixados na membrana com radiação ultravioleta *cross-link* (3 pulsos de 125 mJoules) e com calor (2 horas a 80°C).

Inicialmente, algumas membranas-piloto foram impressas de forma individual para verificação e ajuste dos seguintes parâmetros de depósito: número de depósitos por amostra, (3, 6, 12 e 20 vezes a mesma amostra no mesmo ponto da membrana) e a distância entre os pontos de depósito, quando mais clones menos a distância entre os pontos. Para as bibliotecas de algodão e feijão-caupi por quadrante foram depositados 9 pontos, um padrão definido pelo robô de 3 x 3. Para as bibliotecas de nematóide e amendoim foram depositados 25 pontos por quadrante, padrão 5 x 5. Cada clone foi impresso em duplicada na membrana, em diagonal e em um quadrante de 0,86 cm². A viabilidade destes parâmetros foi avaliada após hibridização com sonda plasmidial (*Overgo*). Uma vez ajustados esses parâmetros, várias cópias das diferentes membranas foram confeccionadas. Após a impressão, desnaturação e fixação, as membranas de macroarranjo de DNA foram armazenadas à temperatura ambiente até o uso, envolvidas em papel *Gel Blotting Paper* (Genetix).

4. Hibridização com sonda plasmidial (*Overgo*)

A marcação da sonda radioativa denominada *Overgo* (*Overlapping oligonucleotide*) foi realizada usando 2 iniciadores de 22 nucleotídeos cada, que são complementares em 8 bp e formam uma sonda *Overgo* de 36-mer. Esses iniciadores foram desenhados a partir do gene de resistência à ampicilina (Amp) que é encontrado em todos os vetores de clonagem de cDNA utilizados para a construção das 4 bibliotecas-alvo desse estudo. A sonda *Overgo* foi marcada com 10 µCi/µL de [α^{32}]dCTP baseada no protocolo desenvolvido pelo CBMEG/Unicamp (<http://cafe.cbmeg.unicamp.br/protoc/macroarray-ing.htm>). Uma vez marcada, a sonda foi purificada em colunas Sephadex TM G-50 (GE), segundo as recomendações do fabricante, desnaturadas a 94°C por 3 minutos e imediatamente utilizadas na hibridização das respectivas membranas. Cada membrana foi hibridizada em condições de alta estrigência (58°C) por 18 horas em 5 mL de uma solução de hibridização contendo: 1% BSA; 1 mM EDTA; 500 mM fosfato de sódio e 3,5% SDS e foram em seguida, lavadas a 58°C em condições crescentes de estrigência (SSC 2x a 0,5x) e expostas a um filme *Ecran IP* (*ImagePlates*; Fujifilm) por 12 a 24 horas.

5. Análise dos dados

Após exposição da membrana hibridizada ao filme *Ecran IP*, as imagens geradas pela sensibilização ao filme foram capturadas em *PhosphorImager BAS-1500* (Fujifilm) e armazenada de forma digitalizada. Em função do resultado, as membranas foram re-expostas por um tempo maior ou menor.

A imagem digitalizada foi então quantificada utilizando o programa *MultiGauge* (Fujifilm), que detecta a intensidade de cada ponto transformando em valores numéricos, gerando, a partir da conversão destes pontos, uma tabela de dados os quais foram estatisticamente normalizados.

Para a quantificação de cada clone, uma grade foi criada auxiliando na quantificação correta de cada clone.

REFERÊNCIAS

CAMPOS, V. P. Café (*Coffea arabica* L.). Controle de doenças. Doenças causadas por nematóides. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. p. 141-180.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, FR, v. 19, p. 555-560, 1996.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, A. R. A.; QUÉNÉHÉRVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. isolates. **Nematology**, Leiden, NL, v. 2, p. 645-654, 2000.

DONSON, J.; FANG, Y.; ESPIRITU-SANTO, G.; XING, W.; SALAZAR, A.; MIYAMOTO, S.; ARMENDAREZ, V.; VOLKMUTH, W. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 75-97, 2002.

GROUSE, L. H.; MUNSON, P. J.; NELSON, P. S. Sequence databases and microarrays as tools for identifying prostate cancer biomarkers. **Urology**, Secaucus, US, v. 57, p. 154-159, 2001.

HAGUE, N. G. M.; GOWEN, R. S. Chemical control of nematodes. In.: BROWN, R. H.; KERRY, B. R. (Ed.). **Principles and practice of nematode control in crops**. London: Academic Press, 1987. p. 131-173.

HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **PNAS**, v. 103, n. 39, p. 14302-14306, 2006.

JORDAN, B. R. Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 124, p. 251-258, 1998.

KUDOH, K.; RAMANNA, M.; RAVATN, R.; ELKAHLOUN, A. G.; BITTNER, M. L.; MELTZER, P. S.; TRENT, J. M.; DALTON, W. S.; CHIN, K. V. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. **Cancer Research**, Baltimore, US, v. 60, p. 4161-4166, 2000.

MOURA, R. M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 281-315, 1997.

SASSER, J. N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 64, p. 36-41, 1980.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics: DNA Differentiation & Development**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 396-403, July 2006.