

Uso da hibridização subtrativa como ferramenta para a identificação de genes envolvidos na resistência à ferrugem da folha do trigo

Paula Wiethölter¹

Sandra Patussi Brammer²

Paulo Roberto da Silva³

Márcia Soares Chaves²

Introdução

A ferrugem da folha do trigo, causada pelo fungo *Puccinia triticina*, está presente em todas as regiões produtoras de trigo do mundo (KOLMER & ORDOÑEZ, 2007). Este fungo é altamente variável, sendo que, no Brasil, até duas novas raças são detectadas a cada ano, embora em alguns anos es-

¹ Bióloga, bolsista Pós-Doutorado Júnior/CNPq. Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Trigo, RS. E-mail: paulawiet@gmail.com.

² Pesquisadora Embrapa Trigo, Caixa Postal 451. 99001-970. Passo Fundo, RS. E-mail: sandra@cnpt.embrapa.br; mchaves@cnpt.embrapa.br.

³ Professor Dr. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03, UNICENTRO - Campus CEDETEG. 85040-080 Guarapuava, PR. E-mail: pabloprs@hotmail.com.

tes eventos não ocorram (CHAVES & BARCELLOS, 2006). Novas raças de *P. triticina* podem se tornar importantes devido à sua ampla disseminação e/ou pela superação da resistência de uma cultivar semeada em grandes áreas (CHAVES et al., 2005).

A resistência genética é a forma mais eficiente e sustentável de controle da doença e pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno. A resistência completa é conferida por genes de maior efeito, geralmente manifesta-se desde o estágio de plântula e é específica à raça. A resistência parcial, em geral, é conferida por mais de um gene de menor efeito, não é específica à raça e expressa-se em planta adulta (PARLEVLIET, 1997).

Os genes de resistência à ferrugem da folha do trigo são denominados Lr (Leaf rust). Atualmente existem 61 genes Lr identificados (MCINTOSH et al., 2008), sendo que a maioria deles confere resistência específica à raça (MANICKAVELU et al., 2010). Entretanto, cultivares de trigo que apresentam este tipo de resistência frequentemente tornam-se suscetíveis em poucos anos (geralmente de um a cinco) de uso, devido à forte pressão de seleção exercida sobre a população do patógeno, levando a esta rápida "superação de resistência" (SINGH & HUERTA-SPINO, 2001).

Por esta razão, a busca por genes de resistência não específicos à raça e que se expressem em planta adulta tem sido objeto de estudo dos fitopatologistas. No trigo, a resistência parcial tem se mostrado durável (JOHNSON, 1984), pois a pressão de seleção exercida sobre a população do patógeno é minimizada.

Toropi é uma cultivar de trigo que apresenta resistência parcial e durável à ferrugem da folha do trigo desde o seu lançamento, em 1965. É caracterizada como uma cultivar suscetível em plântula, porém apresentando baixa severidade da doença em planta adulta (BARCELLOS et al., 2000).

A resistência desta cultivar tem sido investigada na Embrapa Trigo pelo menos há duas décadas. Diversos projetos foram executados em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), visando à compreensão do seu mecanismo de defesa e à identificação dos genes associados. A execução destes projetos resultou na identificação, nesta cultivar, de dois genes recessivos, responsáveis por parte da resistência de planta adulta, denominados temporariamente de Trp-1 e Trp-2 (BARCELLOS, 1994), localizados nos cromossomos 1A e 4D (BRAMMER, 2000). Também foram identificados marcadores moleculares do tipo AFLP associados aos genes Trp-1 e Trp-2, os quais explicaram a variação dos dados fenotípicos em, aproximadamente, 70% (BRAMMER, 2000). Silva (2002) confirmou a localização dos genes nos cromossomos inicialmente identificados por Brammer (2000) com marcadores microssatélites e desenvolveu um marcador PCR-específico associado ao gene Trp-1.

A resistência ou suscetibilidade de uma planta a um fungo causador de ferrugem e a avirulência ou virulência do patógeno em relação à planta é a expressão da interação do complexo gênico e citoplasmático do patógeno, influenciado pelo ambiente que atua sobre o hospedeiro e o patógeno (FLOR, 1956). Segundo Baker et al. (1997), existem dois grupos de genes envolvidos com a resistência a doenças em plantas, os genes de resistência (R) e os genes relacionados

com a defesa (DR). Durante o processo inicial de infecção, ocorre o reconhecimento do produto do gene de avirulência do patógeno (Avr) pelo produto do gene R da planta (BELKHADIR et al., 2004). Após esta interação, uma cascata de sinais é desencadeada, onde diversas moléculas estão envolvidas. Estas, por sua vez, ativam a expressão dos genes DR, desencadeando o processo de resistência completa.

Na resistência não específica à raça (parcial), não se sabe como ocorrem os eventos primários de sinalização. Por esta razão, uma nova linha de investigação foi adotada pela equipe da Embrapa Trigo e da UFRGS, visando ao entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência não específica à raça, presente em Toropi, na primeira hora após a inoculação com o patógeno. Com este projeto, foi possível identificar alguns genes diferencialmente expressos entre plantas segregantes resistentes e suscetíveis, descendentes do cruzamento entre as cultivares Toropi (resistente) e IAC13-Lorena (suscetível), os quais, possivelmente, estão envolvidos no mecanismo inicial de resistência da cultivar Toropi (SILVA, 2006).

A metodologia utilizada para a identificação destes genes diferencialmente expressos entre as plantas resistentes e suscetíveis, descendentes de Toropi e IAC13-Lorena, na primeira hora após a inoculação, foi a hibridização subtrativa suprimida (SSH - Suppression Subtractive Hybridization). Esta técnica é utilizada para amplificar fragmentos de cDNA diferencialmente expressos de interesse (alvo, identificado como amostra "tester") e, simultaneamente, suprimir a amplificação do DNA não-alvo (identificado como amostra "driver") (DIATCHENKO et al., 1996).

A caracterização do processo infeccioso de *P. triticina* e a identificação de genes diferencialmente expressos em Toropi permitirá a identificação de "genes-candidatos" ligados à resistência duradoura da planta, bem como uma melhor compreensão do mecanismo de interação planta-patógeno.

Objetivo

Identificar, por meio da hibridização subtrativa suprimida, sequências diferencialmente expressas envolvidas no mecanismo de defesa em trigo (plantas resistentes e suscetíveis) em resposta à infecção causada pelo fungo *P. triticina*, três horas após a inoculação.

Método

Foram selecionadas previamente quatro plantas resistentes e três plantas suscetíveis à ferrugem da folha do trigo, provenientes do cruzamento entre as cultivares Toropi e IAC13-Lorena. O cruzamento entre as cultivares e a caracterização fenotípica das plantas segregantes foram realizados por Barcellos (1994). A seleção das plantas foi realizada por Silva (2006).

O presente estudo foi desenvolvido dando sequência ao experimento realizado por Silva (2006), que avaliou a expressão diferencial entre os mesmos materiais uma hora após a

inoculação. Por esta razão, o cultivo das plantas e posterior inoculação foi realizado seguindo a mesma metodologia adotada por ele. As plantas foram cultivadas em vasos, na Embrapa Trigo em 2009, sendo mantidas em câmara de crescimento com temperatura, fotoperíodo e umidade controlados (14 h luz a 18 °C; 10 h sem luz a 14 °C; 80% de umidade). O solo utilizado foi composto por 1/3 de terra vermelha, 1/3 de terra preta e 1/3 de vermiculita.

Antes da semeadura, foi realizada uma assepsia na câmara de crescimento com hipoclorito de sódio (4%) para a eliminação de qualquer contaminante. As sementes foram tratadas com fungicida triadimenol, na dose de 270 mL/100 Kg sementes, e com inseticida imidacloprido, na dose de 50 g/100 Kg sementes.

A inoculação foi realizada na fase de planta adulta, com a raça MFT-MT (LONG & KOLMER, 1989) de *P. triticina*, conforme o procedimento de rotina adotado na Embrapa Trigo.

Seguido o período de incubação de três horas após a inoculação, a folha bandeira de cada planta inoculada (resistentes e suscetíveis) foi coletada e armazenada em tubos plásticos (Falcon de 50 mL). O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, em freezer à - 80 °C.

Após a coleta, as plantas permaneceram em câmara escura e úmida por mais 21 horas sendo, posteriormente, transferidas para casa de vegetação com condições de ambiente semi-controladas, a fim de completar o processo de infecção até a manifestação dos sintomas, confirmando-se a eficiência da inoculação.

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Pure Link™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). A purificação do mRNA foi realizada utilizando-se o kit Purification of Poly(A) RNA (Machery-Nagel). A quantidade e a qualidade do RNA total e do mRNA foram avaliadas em espectrofotômetro.

A construção da biblioteca de cDNA subtrativa foi realizada utilizando-se o PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech). Inicialmente, o mRNA foi convertido em cDNA, sendo que o cDNA que continha os genes diferencialmente expressos foram identificados como amostra "tester" (oriundo das plantas resistentes) e o cDNA de referência como amostra "driver" (oriundo das plantas suscetíveis).

Resultados

A eficiência da inoculação foi confirmada em torno de 20 dias após a inoculação do patógeno. Tanto os genótipos parentais (Toropi e IAC13-Lorena), quanto as plantas segregantes resistentes e suscetíveis apresentaram o fenótipo esperado (Fig. 1).

Com a confirmação da eficiência da inoculação, procedeu-se à extração do RNA. Esta etapa foi realizada em bulk, ou seja, o RNA das folhas das plantas resistentes foi extraído em conjunto, assim como o das suscetíveis. Esta estratégia foi adotada a fim de ampliar as chances de identificar uma maior quantidade de genes associados à resistência à doença, uma vez que as plantas podem apresentar diferenças entre si na segregação. A extração de RNA total e a purifica-

ção do mRNA foi eficiente, sendo submetido à hibridização subtrativa suprimida por meio do PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech).

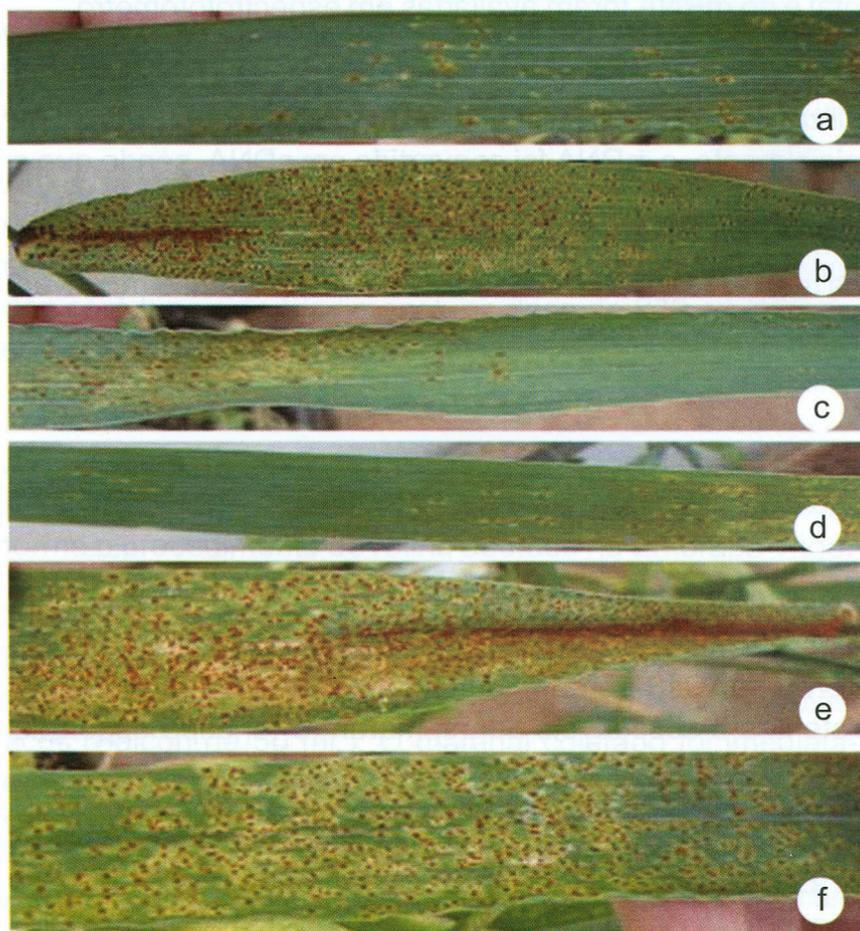


Fig. 1. Fenótipos observados nas folhas inoculadas com o patógeno *Puccinia triticina*. a) Toropi; b) IAC13-Lorena; c, d) plantas resistentes; e, f) plantas suscetíveis.

Fotos: Paula Wiethölter/Márcia Soares Chaves.

Como resultado, foi obtida uma mistura enriquecida com cDNAs diferencialmente expressos entre as plantas testadas, com fragmentos entre 100 e 600 pares de bases. Estes fragmentos foram clonados utilizando o TOPO TA Cloning (Invitrogen) e estão sendo transformados em células competentes de *Escherichia coli* (background TOP10, Exponencial Biotecnologia) pelo método de choque térmico.

Posteriormente, as colônias contendo os plasmídeos recombinantes serão submetidas à extração do DNA plasmidial e, posteriormente, encaminhadas ao sequenciamento. As sequências obtidas serão analisadas, utilizando-se ferramentas de bioinformática, a fim de identificar possíveis funções.

Para a validação dos genes diferencialmente expressos entre os genótipos resistentes e suscetíveis, um novo experimento será instalado em 2010 e as plantas novamente inoculadas e coletadas. Serão desenhados primers a partir das sequências de interesse identificadas, as quais serão testadas com PCR quantitativo quanto à expressão diferencial.

No trabalho desenvolvido por Silva (2006), foram identificadas 59 sequências únicas. Destas, 69% apresentaram homologia com genes depositados em bancos de dados com função conhecida, envolvendo genes codificadores de enzimas relacionadas à síntese e processamento de proteínas, produção de energia, metabolismo dos aminoácidos, transdução de sinais, transportadores, comunicação celular, metabolismo secundário, regulação transcricional, óxido-redutases, citoesqueleto e proteínas de resistência (SILVA, 2006).

Conforme descrito anteriormente, o autor identificou genes

diferencialmente expressos na primeira hora após o contato com o patógeno. Esta estratégia foi adotada visando identificar as primeiras alterações na produção de transcritos, na tentativa de identificar os sinalizadores primários da presença do patógeno, baseada na concepção de que a percepção da presença do patógeno pela planta desempenha um papel fundamental no processo de resistência (MONTESANO et al., 2003).

Conclusão

A identificação de cDNA entre 100 e 600pb, diferencialmente expressos entre os genótipos submetidos à hibridização subtrativa suprimida, indica que, possivelmente, a ativação de genes associados à resistência ocorre nas primeiras horas após o contato com o fungo, embora os sintomas sejam visíveis vários dias depois.

Referências bibliográficas

- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant microbe interactions. **Science**, Washington, DC, v. 276, p. 726-733, 1997.
- BARCELLOS, A. L. **Genética de resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 1994. 163 p. Tese (Doutora-

do em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A. P.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. *Plant Disease*, St. Paul, v. 84, p. 90-93, 2000.

BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 7, p. 391-399, 2004.

BRAMMER, S. P. **Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 2000. 105 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L. Especialização fisiológica de *Puccinia triticina* no Brasil em 2002. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 57-62, 2006.

CHAVES, M. S.; BARCELLOS, A. L.; GERMÁN, S.; SHEEREN, P. L.; DEL DUCA, L. de J. A. ; SÓ E SILVA, M.; CAIERÃO, E. Population dynamics of *Puccinia triticina* in the South Cone region of South America from 1997 to 2004. In: INTERNATIONAL WHEAT CONFERENCE, 7., 2005, Mar del Plata, Argentina. **Abstracts...** Mar del Plata: SAGPyA/INTA, 2005. p. 130.

DA SILVA, P. R. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha do trigo**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DA SILVA, P. R. **Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência**

à ferrugem da folha em trigo. 2006. 137 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. C.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 93, p. 6025-6030, 1996.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.

JOHNSON, R. A. Critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 22, p. 309-330, 1984.

KOLMER, J. A.; ORDOÑEZ, M. E. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 9, p. 1141-1149, 2007.

LONG, D. L.; KOLMER, J. A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p. 525-529, 1989.

MANICKAVELU, A.; KAWAURA, K.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; YAHIAOUI, N.; KELLER, B.; SUZUKI, A.; YANO, K.; OGIHARA, Y. Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*. **DNA Research**, Oxford, p. 1-12, 2010.

MCINTOSH, R. A.; APPELS, R.; DEVOS, K. M.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W. J.; YAMAZAKI, Y. **Catalogue of gene symbols for wheat.** 2008. Disponível em <<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>>. Acesso em: 25 set. 2008.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, E.T. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, p. 73-79, 2003.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, p. 7-15, 1997. Suplemento. Palestra apresentada no XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Poços de Caldas, 1997.

SINGH, R. P.; HUERTA-SPINO, J. Global monitoring of wheat rusts, and assessment of genetic diversity and vulnerability of popular cultivars. In: **RESEARCH Highlights of the CIMMYT wheat program**, 1999-2000. Mexico, DF: CIMMYT, 2001. p. 38-40. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=PmYa4nNavFQC&printsec=frontcover&dq=Research+Highlights+of+the+CIMMYT+wheat+program,+1999-2000&source=bl&ots=qhpO9RNhtE&sig=SfF9MKx7m06MS0TaqmdOxyz2gTk&hl=pt-BR&ei=fIX2S9WJJ9CFuAeepIWVCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CC0Q6AEwAw#v=onepage&q&f=false>.

