

# EXPRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR NEMATÓIDES

Milene SILVESTRINI<sup>1</sup> E-mail: silvestrinim@ig.com.br , Mirian P. MALUF<sup>2</sup>, Oliveira GUERREIRO-FILHO<sup>1</sup> e Wallace GONÇALVES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP. <sup>2</sup>Embrapa Café, Brasília, DF

## Resumo

A identificação de genes relacionados com a resistência de plantas a pragas e doenças é de grande importância para o entendimento dos mecanismos de defesa envolvidos durante o ataque de patógenos. Atualmente, vários desses genes, identificados em diferentes espécies vegetais, já foram caracterizados ao nível molecular e suas seqüências estão disponíveis em Bancos de Dados. Atualmente, com a conclusão do sequenciamento do Genoma Café, homólogos de genes de defesa tiveram suas seqüências estabelecidas. No entanto, estudos de genômica funcional são necessários para que o papel destes genes no mecanismo de resistência aos patógenos do café seja conhecido. Este trabalho tem como objetivo inicial caracterizar os mecanismos de defesa em café, através da identificação e avaliação da expressão de genes relacionados com a resistência a nematóides. Foram realizadas buscas de seqüências homólogas a genes de defesa no Banco de Dados do Genoma Café através do programa BLAST e foram identificados genes pertencentes a 12 categorias de genes de defesa. Em experimentos de infecção controlada, raízes de cafeeiros suscetíveis e resistentes foram infectadas pelo nematóide *Meloidogyne exigua*. Amostras de RNA extraído destas raízes serviram como molde para amplificação de transcritos correspondentes a 6 genes de resistência. Os resultados mostram que os genes avaliados neste estudo apresentam uma expressão basal em raízes infectadas pelo nematóide, sugerindo que a ativação da resposta de defesa é controlada por outras famílias de genes não testadas neste estudo.

**Palavras-chave:** expressão gênica, mecanismos de defesa, fatores de transcrição

## DEFENSE GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO NEMATODE INFECTION

### Abstract

The identification of defense-associated genes is a major step through a complete understanding of pathogen resistance mechanisms in plants. Several plant defense genes have been already identified, sequenced, characterized at molecular level, and are available at GenBank. Recently, with the conclusion of EST-Genome sequencing, coffee homologs for those genes are also known. However, functional analysis is required to entirely understand the role of defense genes during coffee resistance responses. In order to begin this characterization, the main objective of this study is to identify and evaluate gene expression during nematode resistance. Initial data-mining analysis on the Coffee Genome Database allowed the identification of homologs to 12 families of defense-associated genes. Roots from susceptible and resistant coffee plants were infected by *Meloidogyne exigua* in controlled infection time experiments. Expression of 6 identified genes was evaluated through RT-PCR analysis using infected roots RNA. Results showed that gene expression is basal in all tested infection times, which suggests that other gene families not tested in this study control the activation of defense during nematode response.

**Key words:** gene expression, defense mechanisms, transcription factors

### Introdução

O IAC desenvolve pesquisas em melhoramento do cafeeiro desde 1932. Nesse período vários cultivares já foram lançados e recomendados para o plantio nas mais diversas regiões cafeeiras do Estado de São Paulo e do Brasil, incluindo linhagens resistentes à ferrugem. No entanto, apesar de várias linhagens resistentes a doenças e pragas já estarem disponíveis para plantio, o mecanismo envolvido na determinação dessa resistência ainda é desconhecido.

As plantas desenvolvem uma grande variedade de mecanismos de resistência a doenças, que incluem síntese de fitoalexinas, antibióticos, inibidores de protease; deposição de material de parede celular e acumulação de enzimas hidrolíticas como as quitinases. Aparentemente, a resistência da planta depende da habilidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno, e rapidamente induzir os mecanismos de defesa a tempo de limitar a ação do patógeno. A aplicação de tecnologias moleculares tem gerado informações significativas sobre os mecanismos de reconhecimento de patógenos, tradução de sinais e ativação de genes de defesa (Cramer, 1993). Dessa maneira, uma estratégia que tem sido largamente utilizada para o entendimento dos mecanismos de resistência em plantas é a identificação e caracterização molecular de genes envolvidos no processo de defesa de espécies hospedeiras ao ataque de insetos e microorganismos.

Segundo Ryan (2000), os genes envolvidos na defesa vegetal podem ser divididos em três grupos:

- Proteínas anti-nutricionais ou genes de defesa: codificam proteínas de defesa, tais como inibidores de protease, enzimas da biossíntese de compostos metabólicos secundários. Exemplos destas enzimas são a fenilalanina amônia liase (PAL), da via de biossíntese de lignina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e peroxidases, que produzem intermediários reativos de oxigênio (IRO) que atuam no reforçamento da parede celular (Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994).
- Genes de sinalização: produzem compostos voláteis, para repelir os insetos, comunicar o ataque entre partes das plantas e entre plantas. São genes que codificam enzimas como a PAL, chalcona sintase (CHS) e chalcona isomerase, envolvidas na

síntese de flavonóides, como as fitoalexinas, a polifenol oxidase, que produz compostos fenólicos tóxicos (Felton et al., 1992; Bi e Felton, 1995), proteínas inibidoras de proteinases (Farmer et al., 1992; Johnson et al., 1989).

- Genes envolvidos no redirecionamento metabólico: genes que ativam a síntese de enzimas que produzem IRO, que podem atuar também na transdução de sinais, ativando por exemplo a lipoxigenase (LOX), que participa da produção de ácido jasmônico (Bell e Mullet, 1993).

Além destes, os genes que codificam os fatores de transcrição representam outra classe de genes essencial para a regulação dos mecanismos de defesa. Entre os membros das famílias de fatores de transcrição relacionados diretamente com a resposta ao ataque os genes ERF, bZIPs, NPR1, Myb Whirly e WRKY são os mais conhecidos (Eulgem, 2005).

O objetivo deste trabalho é caracterizar a expressão de genes de defesa em genótipos de café durante o ataque de patógenos. Inicialmente a expressão de genes de resistência foi avaliada em raízes de cafeeiros infectadas com o nematóide *Meloidogyne exigua*. Esta caracterização permitirá em uma segunda fase o estabelecimento da função de cada um desses genes na ativação dos mecanismos de defesa em genótipos de *Coffea* selecionados e expressando diferentes padrões de resposta ao ataque de patógenos.

### Material e Métodos

As avaliações foram realizadas em plantas da cultivar Icatu Vermelho de *Coffea arabica* segregantes para resistência a *M. exigua*. Raízes de estacas correspondentes a plantas suscetíveis e resistentes foram inoculadas com suspensão de ovos do nematóide (Silvarolla et al., 1998). Amostras de raízes foram coletadas 3, 10 e 21 dias após o inoculo. O RNA total foi extraído de raízes infectadas.

As análises *in silico* foram realizadas através de ferramentas de bioinformática desenvolvidas pelo Laboratório de Genômica e Expressão / Unicamp. Sequências correspondentes a genes específicos expressos durante a resposta de defesa foram identificadas nos bancos de sequências ESTs oriundos do Projeto Genoma Café. As buscas identificaram inúmeros *reads* com homologia a genes de defesa identificados em outras espécies. As sequências foram agrupadas para identificação de sequências únicas consenso, ou contig, para cada gene estudado. A análise de *data-mining* permitiu a identificação de 12 classes de genes de defesa e o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para amplificação de 14 locos nos materiais de estudo (Tabela 1). Neste trabalho foi avaliada a expressão de genes correspondentes à *Superóxido dismutase* (SupDisA e SupDisC), fator de transcrição *WIPK* (WipkA), *Glucanases* (Glu A) e *proteínas de resistência* (ResproB e 5-RM1).

A expressão dos genes selecionados foi avaliada pela metodologia de RT-PCR. Oligos específicos ao gene da actina foram utilizados como controle positivo da qualidade e quantidade inicial de mRNA na reação.

### Resultados e Discussão

Os resultados preliminares da análise de *data-mining* estão resumidos na Tabela 1. De maneira geral a variabilidade genética identificada nesta análise é baixa. A classe de genes com a maior variabilidade é a das proteínas de resistência, que apresentou 23 *contigs*. Já famílias nas quais se esperaria uma maior diversidade, como é o caso dos RGAs e de inibidores de proteinase, um número reduzido de *contigs* foi identificado, indicando uma baixa variabilidade dentro destas classes. Fatores de transcrição como Map kinase, B-zip e RGA são codificados em outras espécies de plantas por famílias de genes com alta variabilidade (Revisto em Eulgem 2005). No entanto, os resultados obtidos até o momento confirmam dados de análises de marcadores moleculares, que demonstram uma reduzida variabilidade genética na espécie *C. arabica*. Além disso, estes resultados poderiam explicar a alta susceptibilidade a patógenos observada nas linhagens de *C. arabica*.

**Tabela 1** - Genes de resistência identificados no Banco de Dados do Genoma Café

Genes de Resistência	Nº de Contigs
Fator de transcrição B-zip	5
Catalase	2
Glucanase	10
Lipoxigenase	7
Map Kinase WIPK	1
NO sintase	2
Polifenilalanina liase (PAL)	5
Polifenol oxidase	2
Inibidores de proteinase	3
Proteínas de resistência	23
Superóxido dismutase	12
RGAs (domínios NBS e LRR)	8

Para estabelecimento das rotas de defesa ativadas durante resposta à infecção por nematóides, foi iniciada uma análise do padrão de expressão de genes de resistência em progênies de Icatu suscetíveis e resistentes a *M. exigua*. A expressão dos locos amplificados pelos oligos gene-específicos SupDis A, Sup Dis C, WIPK A, Glu A, Respro B e 5-RM1 foi avaliada em raízes infectadas pelo nematóide. Os resultados são apresentados na Figura 1 e Tabela 2.

**Tabela 2:** Padrões de expressão de genes de resistência em plantas de Icatu segregantes para resistência e susceptibilidade a nematóides inoculadas em diferentes tempos com *Meloidogyne exigua*.

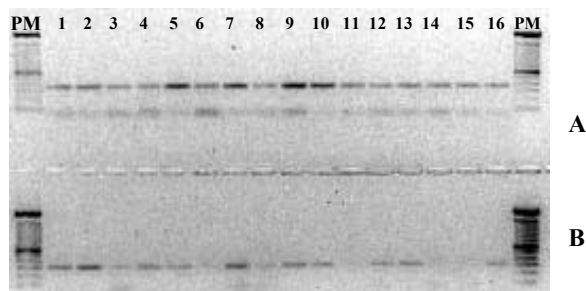
Seqüências	Susceptíveis								Resistentes							
	Gen 224				Gen 621				Gen 1297				Gen 1814			
	0	3 d	10	21	0	3	10	21	0	3	10	21	0	3	10	21
SupDis A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SupDis C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WIPK A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glu A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ResPro B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 - RM1	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-	-	+

+ = expressão acentuada  
+/- = expressão atenuada  
- = sem expressão

Transcritos correspondentes aos genes SupDis A, Sup Dis C, WIPK A, Respro B foram observados em todos os tempos de inoculação avaliados, sem diferenças quantitativas significativas (Tabela 2, Figura 1). Transcritos correspondentes ao gene Glu A não foram observados no genótipo resistente 1814 nos tempos 0 (raízes não-inoculadas) e após 3 dias de inoculação com *M. exigua*. O gene 5-RM1 apresentou também um padrão de expressão distinto. Diminuição no acúmulo de transcritos 5-RM1 foi observada em genótipos susceptíveis e resistentes entre 3 e 10 dias após a inoculação. Por outro lado um dos genótipos resistentes, o 1814, não apresentou transcritos do gene 5-RM1 (Figura 1 e Tabela 2). De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho não demonstram variações significativas no padrão de expressão de alguns genes de resistência. Pelo contrário, os genes testados apresentam uma expressão basal mesmo na ausência do patógeno. Além disso, foram observadas diferenças na expressão de genes entre plantas com mesmo tipo de resposta de resistência.

Variações no padrão de expressão gênica são esperadas entre plantas resistentes e susceptíveis durante resposta de defesa. No entanto, estudos de transcriptomas em plantas demonstram que a ativação da resposta de defesa é associada mais com diferenças quantitativas da expressão dos genes, sugerindo que a resposta basal tem um papel essencial no reconhecimento do patógeno e na iniciação da resposta (Tao *et al.*, 2003; Eulgem, 2005). Nesse sentido, genes que irão controlar essa resposta, tais como genes de fatores de transcrição, devem ter sua expressão visivelmente alterada. O gene WIPK A, da família das *Map-Kinases*, é o único fator de transcrição avaliado neste estudo. Este não apresentou diferenças quantitativas no acúmulo de transcritos durante a infecção, indicando que provavelmente esta família de genes não é responsável direta pela ativação da resposta de defesa dos cafeeiros testados. O fato de outros genes, como o 5-RM1, não apresentarem o mesmo tipo de expressão entre genótipos resistentes ou susceptíveis indica que a ativação específica da resposta de defesa é controlada por outras famílias de genes.

Análises da expressão de outras famílias de genes de resistência darão continuidade à caracterização dos mecanismos de defesa em café e à identificação dos genes responsáveis pelo desencadeamento das respostas de resistência específicas para cada patógeno.



**Figura 1** – Fragmentos correspondentes às seqüências ResProt B (A) e 5 – RM1 (B) amplificados a partir de RNA total extraído de raízes de progênies de Icatu segregantes susceptíveis - 224 (1-4) e 624 (9-12), e resistentes – 1297 (5-8) e 1814

(13-16) - inoculadas em diferentes tempos com *M. exigua* - Não inoculado (1, 5, 9, 13), 3 dias (2, 6, 10, 14), 10 dias (3, 7, 11, 15) e 21 dias (4, 8, 12, 16).

### Referências Bibliográficas

BELL, E.; MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* s.l., v.103, p. 1133-1137, 1993.

BI, J.C.; FELTON, G.W. Folia oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.*, s.l., v. 21, p. 1511-1530, 1995.

BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor and wound-induced oxidative crosslinking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell.* s.l., v. 70, p. 21-30, 1992.

BRISSON, L.F.; TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of oxidase cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* s.l., v. 6, p. 1703-1712, 1994.

CRAMER, C.L.; WEISSENBORN, D.; COTTINGHAM, C. K.; DENBOW, C. L.; EISENBACK, J. D.; RADIN, D. N.; YU, X. Regulation of defense – related gene expression during plant -pathogen interactions. *Journal of Nematology*, s.l., v. 25, n. 4, p. 507-518, 1993.

EULGEM, T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, v. 10, p.71-78, 2005.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* s.l., v. 4, p. 129-134, 1992.

FELTON, G.W.; DONATO, D.D.; BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietary protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* s.l., v. 38, p. 277-285, 1992.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C.A. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 9871-9875, 1989.

RYAN, C.A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure et Molecular Enzymologica*, s.l., v.1477, p. 112-121, 2000.

SILVAROLLA, M.B.; GONÇALVES, W. & LIMA, M.M.A Resistência do cafeeiro a nematóides V - Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira* 22(1): 51-59, 1998.

TAO, Y. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* v.15, p. 317- 330, 2003.