

**ISOLAMENTO DE SEQÜÊNCIAS DE *Arachis stenosperma* EM
RESPOSTA À INFECÇÃO DE *Puccinia arachidis* e *Cercosporidium*
personatum por cDNA-AFLP**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Helio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretores Executivos

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes

Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 94

**ISOLAMENTO DE SEQÜÊNCIAS DE *Arachis
stenosperma* EM RESPOSTA À INFECÇÃO DE
Puccinia arachidis e *Cercosporidium personatum*
por cDNA-AFLP**

**Soraya C. M. Leal-Bertioli
Leonardo Guedes
Patrícia M. Guimarães
Alessandra P. Fávero
David J. Bertioli**

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) 3448-4600 Fax: (61)
3340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

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 Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005)

I 85 Isolamento de seqüências de *Arachis stenosperma* em resposta à infecção de *Puccinia arachidis* e *Cercosporidium personatum* por cDNA-AFLP / Soraya C. M. Leal-Bertioli ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

18 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 94)

1. *Arachis stenosperma* – polimorfismo – identificação de genes. 2. *Arachis* - estudo molecular - interação de doenças fúngicas. 3. *Arachis* – variedade resistente. I. Leal-Bertioli, S. C. M. II. Série.

635.6596 – CDD 21.

**ISOLAMENTO DE SEQÜÊNCIAS DE *Arachis
stenosperma* EM RESPOSTA À INFECÇÃO DE
Puccinia arachidis e *Cercosporidium personatum*
por cDNA-AFLP**

**Soraya C. M. Leal-Bertioli¹
Leonardo Guedes²
Patrícia M. Guimarães³
Alessandra P. Fávero⁴
David J. Bertioli⁵**

¹ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Estudante de Ciências Biológicas, UnB

³ Engenheira Agrônoma, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Engenheira Agrônoma, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Biólogo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUÇÃO | 9 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 9 |
| DISCUSSÃO..... | 12 |
| REFERÊNCIAS | 13 |
| RESULTADOS..... | 11 |

RESUMO

Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) de DNA complementar (cDNA) foi utilizado para identificar genes de *Arachis stenosperma*, um parente silvestre do amendoim, expressos durante interação com o agente causal da ferrugem, *Puccinia arachidis* e da mancha preta, *Cercosporidium personatum*. Os fragmentos isolados derivados de transcritos (TDFs) correspondem a genes diversos, inclusive envolvidos no processo de resistência. Genes relacionados a fosfoesterase, helicase, proteína LRR e uma misteriosa proteína de “torcicolo” de drosófila foram identificados por homologia no BLAST. Este trabalho constitui o primeiro estudo molecular de interação de doenças fúngicas e uma espécie silvestre de *Arachis* resistente aos patógenos estudados.

ABSTRACT

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) of complementary DNA (cDNA) was used to identify genes from a wild relative of peanut (*Arachis stenosperma*) expressed during the interaction with the causal agent of the rust, *Puccinia arachidis* and late leaf spot, *Cercosporidium personatum*. The isolated transcript-derived fragments (TDFs) correspond to genes involved in the resistance process. Genes related to calcineurin-like phosphoesterase, helicase, a leucine-rich repeat family protein and a mysterious crooked neck protein were identified through BLAST search. This work constitutes the first report of the molecular study of the interaction of fungal diseases and a resistant wild *Arachis*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* possui 80 espécies descritas, todas nativas da América do Sul. Inclui o amendoim cultivado, *A. hypogaea* L., uma leguminosa importante por ser rica em óleo e proteína. No entanto, é uma espécie muito susceptível a várias doenças e pragas. No Brasil, o maior estado produtor é São Paulo, onde os maiores problemas de natureza biótica são: a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia arachidis* Speg, e as manchas foliares *Cercospora arachidicola* Hori (Mancha castanha ou *Early leafspot*), *Cercosporidium personatum* (Berk. e Curt.) Deighton (Mancha preta ou *Late leafspot*). Todas causam desfolhação e em combinação, pode causar a perda de até 70% da produção (SUBRAHMANYAM et al., 1983; MORAES et al., 1994).

As cultivares de amendoim mais plantadas no Brasil, *A. hypogaea* cv. Tatu e IAC-Runner são ambas suscetíveis a estas e outras doenças fúngicas, além de terem baixa variabilidade genética (MORAES e GODOY, 1995). Espécies silvestres são uma fonte comprovada de resistências a diversas pragas e patógenos (NELSON et al., 1990; LEAL-BERTIOLI et al., 2003; FÁVERO, 2004, SUBRAHMANYAN et al., 1983) (dados nossos, não publicados), sendo assim, uma valiosa fonte de genes para ampliação da base genética do amendoim (STALKER, 1984). Na nossa experiência, *A. stenosperma* V10309 tem sido resistente a todas as pragas testadas (dados não publicados).

Este é o primeiro trabalho que descreve o isolamento de seqüências de espécies silvestres de amendoim, com altos níveis de resistência em resposta à infecção por fungos foliares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inoculação das plantas

Plantas de *A. stenosperma* acesso V10309 foram inoculadas com fungos pelo método da folha destacada em placas de petri de acordo com Moraes e

Salgado (1982). Folhas de *A. hypogaea* (susceptível a ambos fungos foliares) foram utilizados como controle positivo.

A cultura de *Cercosporidium personatum* foi isolada de folhas de amendoim em Campinas, na safra 2002/2003. A cultura é mantida em meio aveia-ágar e repicada a cada 20 dias. Para *Puccinia arachidis*, inóculo foi coletado de folhas com infecção espontânea de plantas de amendoim em casa de vegetação telada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Uredósporos de ferrugem foram coletados das folhas por raspagem com lamínula.

Para ambos patógenos, uma suspensão de 500.000 esporos/mL em 0,5% de Tween 20 foi espalhada na superfície adaxial (mancha preta) ou abaxial (ferrugem) da folha. Placas de petri foram mantidas a temperatura ambiente (cerca de 25°C). Folhas foram coletadas 96h após inoculação, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até utilização.

2. cDNA-AFLP

RNAs foram extraídos de 2g de folhas usando Trizol reagent (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 100ng de RNA total usando Transcriptase Reversa SuperScript II (Invitrogen), com o primer oligo dT(17). A segunda fita do cDNA foi sintetizada usando DNA polymerase I e RNase H. Subseqüentemente, cDNA dupla fita foi clivado com as enzimas *Pst*I e *Mse*I. Ao produto de digestão foram ligados adaptadores para *Pst*I e *Mse*I (Tabela 1). Pré-amplificação foi realizada utilizando 1:10 da alíquota dos produtos de ligação, usando primers correspondendo aos adaptadores, sem bases seletivas (primers M00 e P00, Tabela 1. O programa do termociclador foi como a seguir: 94°C por 1 min, 26 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72° por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 2 min.

Uma alíquota do produto da pré-amplificação foi utilizada para a amplificação, juntamente com primers com três bases seletivas, com um programa do tipo "touch-down": 13 ciclos de 94°C por 30 seg, 65°C por 30 seg (-0,7°C por ciclo) e 72°C por 1 min, 23 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C

por 30 seg e 72°C por 1 min. Um total de oito combinações de primers foram usados. Estes produtos de amplificação seletiva foram separados em gel de poliacrilamida a 5%, corados de acordo com o protocolo descrito por Creste et al. (2001).

3. Seqüenciamento de bandas e análise de seqüências

Bandas que mostraram diferenças de expressão foram isolados do gel, diluídos em 100µL de água destilada e autoclavada, aquecidos a 95°C por 5 minutos e deixados por 14 horas à temperatura ambiente. Uma alíquota de 5µL foi utilizada como alvo para PCR com as mesmas condições utilizadas na amplificação original. Produtos de PCR foram purificados usando o kit QIAQuick (Quiagen) e quantificados em gel de agarose. Sessenta nanogramas foram utilizados para seqüenciamento em seqüenciador 3700 ABI (Applied Biotechnologies), de acordo com instruções do fabricante. As seqüências foram analisadas usando os módulos Pregap e Gap do Staden Package. Homologias foram encontradas usando BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) contra as seqüências depositadas no Genbank, e contra o banco de dados de ESTs de *Arachis stenosperma* EST data bank (Proite et al., 2005).

Tabela 1. Seqüência dos primers e adaptadores utilizados neste estudo

| Primer/adaptador | Seqüência |
|------------------------|---|
| Adaptador <i>Pst</i> I | (+) TGT ACG CAG TCT AC (-) CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA |
| Adaptador <i>Mse</i> I | (+) TAC TCA GGA CTC AT (-) GAC GAT GAG TCC TGA G |
| M00 | GAT GAG TCC TGA GTA A |
| P00 | GAC TGC GTA CAT GCA G |
| P11 | GAC TGC GTA CAT GCA GAA |
| P13 | GAC TGC GTA CAT GCA GAG |
| MseGCA | GAT GAG TCC TGA GTA AGC A |
| MseGGC | GAT GAG TCC TGA GTA AGG C |
| MseGCT | GAT GAG TCC TGA GTA AGC T |
| MseGGA | GAT GAG TCC TGA GTA AGG A |
| MseGCG | GAT GAG TCC TGA GTA AGC G |

RESULTADOS

O controle positivo (*A. hypogaea* cv Tatu) foi inoculado com Ferrugem e Mancha preta Cp e apresentou sintomas após 30 e 40 dias, respectivamente. Todos os experimentos foram feitos com RNA total. Neste estudo foram utilizadas oito combinações de primers com três bases seletivas, por apresentarem perfis com bandas discretas. Experimentos também foram realizados com primers com duas bases seletivas, entretanto, os mesmos deram origem a rastros, desta forma, estes resultados não são aqui apresentados (Figura 1). Das oito combinações de primers com três bases seletivas, foram amplificadas 96 bandas (TDFs) no total. Destas, 28 foram polimórficas, ou seja, foram presentes em apenas um ou alguns dos tratamentos.

Destas, 20 bandas foram amplificadas, obtendo-se 13 seqüências de boa qualidade (Phred 20). Várias bandas (ex. C1, C2, C3, C5 e C6) apesar de migrarem em posições diferentes no gel de poliacrilamida, agrupam-se em um mesmo contig, representando assim, diferentes versões da mesma seqüência. Dos contigs formados com as leituras obtidas, apenas quatro apresentaram homologia quando comparadas com seqüências presentes no NCBI. Uma destas seqüências presentes apenas em folhas inoculadas com *P. arachidis*, denominada As_F1_P11_GCG apresentou forte homologia com uma proteína do tipo LRR (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O acesso V10309 de *Arachis stenosperma* é resistente a todas as pragas e patógenos de amendoim testados pelo nosso grupo: os nematóides das galhas *Meloidogyne arenaria* raças 1 e 2, *M. javanica* raça 4 e *M. hapla*, ao nematóide dos bulbos, *Ditylenchus destructor*, e aos fungos foliares *C. personatum*, *Cercospora arachidicola* e *Puccinia arachidis*, além da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (dados não publicados). Por este motivo, verificamos ser esta uma excelente fonte de resistências não disponíveis no amendoim cultivado. A análise de genes envolvidos nesta resposta de

resistência tem grande valor na compreensão dos mecanismos de resistência, no desenvolvimento de marcadores moleculares para seleção assistida e no potencial isolamento de genes para transformação genética de plantas. Neste trabalho, folhas destacadas de *A. stenosperma* V10309 foram desafiadas com cepas das duas principais doenças foliares que ocorrem no Brasil: mancha preta e ferrugem. O dado mais interessante foi o de folhas desafiadas com ferrugem, da qual isolamos uma seqüência com homologia a um gene que codifica a uma proteína rica em leucina (LRR). Regiões ricas em leucina, acopladas a regiões de ligação de nucleotídeo (NBS) fazem parte da maioria dos genes de resistência identificados até o momento. Seqüências conservadas dos NBSs têm sido utilizadas para o isolamento de partes de genes de resistência por PCR (BERTIOLI et al., 2003). Entretanto, a falta de conservação encontrada na parte LRR dificulta a construção de primers degenerados, conseqüentemente, seu isolamento e análise. Uma vez que esta seqüência foi isolada, para se avaliar o aumento de expressão em resposta à infecção pela ferrugem, serão feitos Northern Blots, com RNA total de folhas infectadas e não infectadas, utilizando o fragmento amplificado como sonda.

Este experimento demonstrou a utilidade da técnica de cDNA-AFLP para identificar seqüências transcritas diferencialmente em resposta à infecção por patógenos em *Arachis*. Este trabalho está tendo continuidade, com testes de um maior número de primers, e estendendo o escopo das investigações para estresses abióticos, como salinidade e seca.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search Programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; LION, M. B.; SANTOS, V. L.; PAPPAS JÚNIOR, G.; CANNON, S. B.; GUIMARÃES, P. M. A large scale

analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 270, p. 34-45, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004. Não paginada. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; FÁVERO, A. P.; MORETZSOHN, M. C.; PROITE, K.; BERTIOLI, D. J. Amendoim selvagem: uma fonte de resistência a pragas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 31, jul./dez. 2003. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br>. Acesso em: Dezembro 2003.

MORAES, S. A.; GODOY, I. J. Avaliação da resistência a *Cercosporidium personatum* em genótipos de *Arachis hypogaea*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 11, p. 141-151, 1995.

MORAES, S. A.; GODOY, I. J.; MARTINS, A. L. M.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; PEDRO JÚNIOR, M. J. Epidemiologia da mancha preta (*Cercosporidium personatum*) em amendoim: resistência, controle químico e progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 532-540, 1994.

MORAES, S. de A.; SALGADO, C. L. Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Bert & Curt.) Ell. & Ev. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 8, p. 39-55, 1982.

NELSON, S. C.; STARR, J. L.; SIMPSON, C. E. Expression of resistance to *Meloydogine arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. **Journal of Nematology**, College Park, Md., US, v. 22, p. 423-425, 1990.

NELSON, S. C.; STARR, J. L.; SIMPSON, C. E. Expression of resistance to *Meloydogine arenaria* in *Arachis batizocoi* and *A. cardenasii*. **Journal of Nematology**, College Park, Md., US, v. 22, p. 423-425, 1990.

PROITE, K.; BERTIOLI, D.; LEAL-BERTIOLI, S.; GUIMARÃES, P. Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, ago. 2005. Resumo 647. Suplemento: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília, DF.

STALKER, H. T. Utilizing *Arachis cardenasii* as a source of *Cercospora* leafspot resistance for peanut improvement. **Euphytica**, Wageningen, NL, v. 33, p. 529-538, 1984.

SUBRAHMANYAM, P.; MCDONALD, D.; GIBBONS, R. W.; SUBBA RAO, P.V. Components of resistance to *Puccinia arachidis* in peanuts. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 73, p. 253-256, 1983.

Tabela 2: Seqüências de *A. stenosperma* V10309 expressas diferencialmente em resposta à infecção por *Cercosporidium personatum* (CpCamp) ou *Puccinia arachidis* (Ferrugem)

| TDF | Tamanho (pb) | Combinação de primers | Proteína homóloga (BlaSTx) | E value | Agente elicitor |
|---------------|--------------|-----------------------|---|------------|-----------------|
| As_E1_GAG* | 816 | P11 + GAG | crooked neck protein | e^{-9} | CpCamp |
| AS_B5_GCT | 330 | P11 + GCT | SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein / RING finger | $6e^{-8}$ | Ferrugem |
| As_A1_P11 | 252 | P11 + GCA | domain-containing protein / helicase | $4e^{-12}$ | Ferrugem |
| As_F1_P11_GCG | 447 | P11 + GCG | leucine-rich repeat family protein | e^{-6} | Ferrugem |

*este TDF apresentou homologia com o clone de EST AS1RM9P1F09, presente em uma biblioteca de *A. stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*.

Figura 1. Padrão de fragmentos detectados por cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5% e corados com prata. O padrão foi gerado folhas de *A. stenosperma* V10309 inoculadas com *C. personatum* (C), *P. arachidis* (F) e folhas não inoculadas (N). As reações foram realizadas com os primers P11 e MseGGA e estão em duplicata.

N F C

