

Quantificação relativa da expressão do gene xiloglucana endotransglicosilase em linhagens de soja resistentes e suscetíveis à *Meloidogyne javanica*

Aguida Maria Rodrigues Morales^{1,2}; E. G. M. Lemos¹; Renata Fuganti^{2,3}; L. C. Alves¹; S. R. R. Marin²; João Flávio Veloso Silva²; Waldir Pereira Dias²; Carlos Alberto Arrabal Arias²; José Renato Bouças Farias²; Alexandre Lima Nepomuceno².
¹Universidade Estadual Paulista UNESP/FCAV - Jaboticabal, aguida@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja; ³Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Introdução

O consumo mundial de soja e seus derivados têm crescido a um ritmo médio anual de cinco milhões de toneladas. A produção mundial de soja na safra 2004/2005 chegou a 213,2 milhões de toneladas (Embrapa, 2006). Neste cenário os EUA disparam em volume e continuam no topo do *ranking* com 85,02 milhões de toneladas. O Brasil ostenta a privilegiada posição de segundo maior produtor de soja, com 51,09 milhões de toneladas, cerca de 28% do total mundial.

Estima-se que, aproximadamente 10 milhões de toneladas da safra brasileira de 2004 tenham sido perdidas devido a fatores abióticos e bióticos (Conab, 2005) e dentre estes estão as doenças causadas por nematóides fitoparasitos. A obtenção de maiores rendimentos com menores riscos na produção da soja, devido a perdas ocasionadas por nematóides, demonstram a urgência da necessidade de se tentar amenizar esse problema através de tecnologias mais aprimoradas (Ferraz, 2001).

Em resultados preliminares de análise de microarranjos de DNA, utilizando uma biblioteca de cDNA com materiais inoculados com o nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*, o gene que codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase (XET) (nº de acesso no *GenBank* AI495154) foi diferencialmente expresso no parental resistente inoculado. Esta enzima está envolvida no processo de espessamento da parede celular que ocorre

em determinadas plantas submetidas a estresses tais como o ataque de nematóides e tem sido relatada na literatura como sendo um mecanismo de defesa, sendo por esta razão escolhida para o estudo de PCR em tempo real.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão do gene que codifica a enzima xiloglucana endotransglicosilase (XET) em diferentes linhagens de soja resistentes e suscetíveis utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR).

Material e Métodos

Sementes de linhagens parentais de soja resistentes (genótipo PI595099) e suscetíveis (cultivar BRS133) ao nematóide *Meloidogyne javanica* e sementes de indivíduos resistentes (JF7002 JF7027 e JF7056) e suscetíveis (256-S, 259-S e 266-S) resultantes do cruzamento entre estes parentais foram colocadas para germinar em câmara de germinação. Após 7 dias as plântulas foram transferidas para tubetes contendo areia na casa de vegetação e em seguida, foram inoculadas com uma suspensão contendo 1200 juvenis (J2) do nematóide por planta. Raízes de todos os materiais foram coletadas nos tratamentos de um, três e seis dias após a inoculação e armazenadas a -80°C . Para confirmação da presença do nematóide, amostras de raízes foram coradas com fucsina ácida, observadas em lupa e fotografadas.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi feita a síntese de cDNA, utilizando primers oligodT.

Uma curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA, para se determinar a concentração ideal a ser utilizada nas análises. As reações de PCR foram preparadas em triplicatas, e um controle endógeno, o gene rRNA 18S (nº de acesso no *Genbank* XO2623.1) também foi incluído. A quantificação relativa foi realizada primeiramente com os parentais utilizando bulks de cDNA das três datas de coleta nos tratamentos inoculados e não inoculados com o nematóide resultando em quatro bulks. Posteriormente, a quantificação relativa foi feita em indivíduos da

população, resultando em seis amostras resistentes: JF7002 inoculado e não inoculado, JF7027 inoculado e não inoculado, JF7056 inoculado e não inoculado, e seis amostras suscetíveis: 256-S inoculado e não inoculado, 259-S inoculado e não inoculado 266-S inoculado e não inoculado. Todas as análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se o software SDS (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

Resultados e Conclusões

A coloração das raízes com fuscina ácida comprovou que a inoculação com o J2 do nematóide *Meloidogyne javanica* foi eficiente, pois em todos os materiais inoculados a presença do nematóide foi observada, tanto nos parentais como nos indivíduos da população.

A quantificação relativa da expressão do gene XET nos parentais indicou que ele se expressava em todos os materiais, porém em diferentes níveis (Gráfico 1).

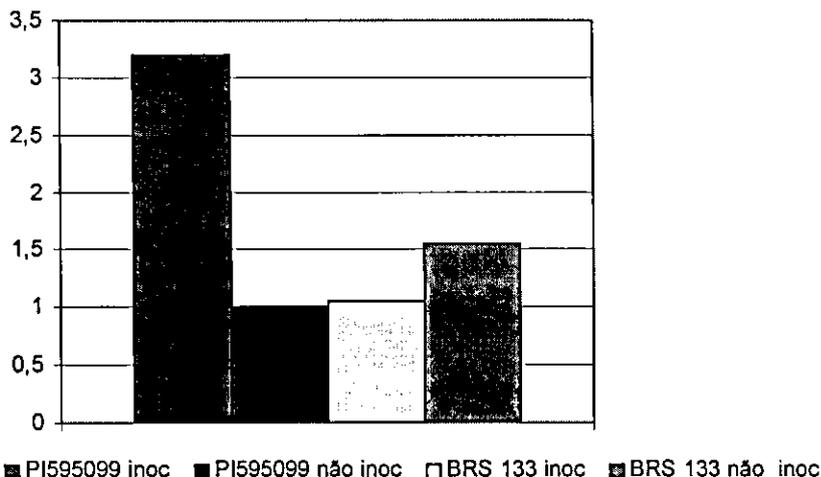


Gráfico 1. Gráfico mostrando o parental resistente PI595099 não inoculado, utilizado como calibrador (valor 1) e a expressão do gene da XET, no parental resistente PI595099 inoculado, parental suscetível BRS133 inoculado e não inoculado. O cDNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coletas após a inoculação com juvenis do nematóide.

Como os níveis de expressão no material resistente inoculado foram superiores aos outros materiais, uma quantificação relativa deste gene nos indivíduos da população também foi realizada (Gráfico 2).

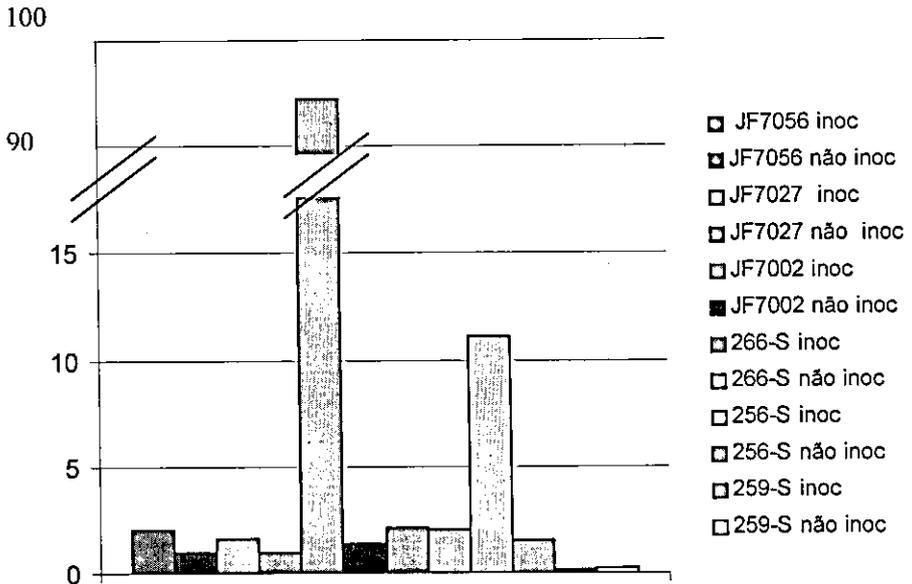


Gráfico 2. Gráfico mostrando a quantificação relativa da expressão do gene XET nos indivíduos da população. A amostra resistente JF7027 não inoculada foi utilizada como calibrador (valor 1). O cDNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coleta após a inoculação com juvenis do nematóide.

Os resultados mostraram que comparando-se as amostras resistentes com as suscetíveis, os indivíduos resistentes inoculados apresentaram maior expressão do gene da XET, confirmando os resultados obtidos com as amostras dos parentais.

A enzima xiloglucana endotransglicosilase é responsável por processos relacionados com a resposta da planta à infecção por patógenos como o espessamento de parede celular. Está envolvida principalmente em processos de modificação da parede celular, incluindo síntese e degradação de compostos. A enzima XET catalisa a quebra intramolecular de polímeros

de xyloglucanas, principal composto de proteínas estruturais da parede celular como hemicelulose, celulose, pectinas e outras (Campbell e Braam, 1999). Este espessamento da parede dificulta a penetração do nematóide nas células vegetais, evitando a infecção.

Estes resultados mostraram que a inoculação com juvenis do nematóide pode promover uma resposta da planta à infecção, uma vez que o espessamento da parede é um mecanismo primário de defesa contra patógenos. Outros estudos também serão realizados comparando-se os tratamentos em separado, ou seja, a expressão dos genes será quantificada nos dias um, três e seis após a inoculação, a fim de se verificar a existência de diferenças temporais de expressão gênica e se houver, qual o momento exato da indução que resulta em aumento da expressão da XET.

Referências

CAMPBELL, P.; BRAAM, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. **Trends in plant science**. Vol 4. n 9. 361-366. 1999.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível no site <www.conab.gov.br> 2005.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em <www.cnpso.embrapa.br> 2005. Acesso em julho de 2006.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 127 p, 2001.