

PROSPECÇÃO DE GENES EM MILHO ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A

Spodoptera frugiperda

CARNEIRO, N. P.¹, VIANA, P. A.¹, GUIMARÃES, P. E. O.¹, CARNEIRO, A. A.¹. Pesquisador(a)
Embrapa Milho e Sorgo; newtonc@cnpmc.embrapa.br

Introdução

No Brasil, são produzidas em média 30 milhões de toneladas de grãos de milho por ano, provenientes de aproximadamente 57% da área nacional ocupada com cultivo de cereais. Por ser uma fonte de baixo custo de carboidratos, proteínas e óleo, com uma ampla distribuição geográfica, o milho não somente é utilizado de forma direta na dieta humana e de animais, mas também tem valor industrial para produção de bebidas, medicamentos, tintas, plásticos, explosivos, etc. Assim, considerada como uma importante cultura para as necessidades atuais da sociedade moderna, a demanda de consumo e de mercado de milho vem sofrendo contínuo aumento, tanto em nível nacional como mundial. A própria elevação do consumo de derivados de aves e suínos exige indiretamente aumento na disponibilidade de milho, devido a sua incorporação nas rações de crescimento. Para enfrentar tal situação com auto-suficiência e independência tecnológica, é necessário incrementar a produtividade da cultura por área plantada, tanto com estratégias de redução de custos quanto com incorporação de novas tecnologias ao processo de produção; nesse contexto, torna-se fundamental o desenvolvimento de germoplasma mais produtivo e adaptado aos diversos sistemas de cultivo, bem como a condições edafo-climáticas marginais, sujeitas a inúmeros fatores bióticos e abióticos de estresse à cultura. Raças adaptadas da ‘lagarta-do-cartucho’ (ordem: Lepidoptera; espécie: *Spodoptera frugiperda*) compõem uma das mais importantes pragas que afetam genótipos tropicais de milho, chegando a causar até 34% de redução na produção dessa cultura no Brasil (Cruz, 1995). Tradicionalmente (pós -‘Revolução Verde’), o controle de tal praga é realizado com base em inseticidas químicos, que intrinsecamente podem trazer conseqüências colaterais negativas em termos de toxicidade ao homem, animais e ao meio-ambiente em geral. Como alternativa a essa sistemática de controle, há o chamado ‘Manejo Integrado de Pragas’ (MIP) que consiste na utilização das várias medidas de controle disponíveis, visando atingir eficiência econômica com consciência ecológica e social. Dentre as medidas de controle mais eficientes encontra-se a utilização de genótipos tolerantes a praga. Desde meados da década passada, a EMBRAPA Milho e Sorgo vem desenvolvendo estudos visando identificar fontes de resistência de milho e sorgo às principais pragas e doenças. Estudos sobre a herança (Guimarães e Viana, 1994) e os mecanismos de resistência (Viana e Potenza, 2000) foram conduzidos em alguns genótipos selecionados, sem contudo conhecer as causas dessa resistência. Os projetos de seqüenciamento de genes expressos em milho, sob

determinadas condições, têm se tornado uma das principais estratégias na identificação de genes relacionados a diferentes processos biológicos, facilitando o entendimento das bases moleculares da expressão de características agronomicamente importantes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar genes de uma biblioteca enriquecida de genes induzidos pela *S. frugiperda* em folhas de genótipos de milho resistentes na presença dessa praga visando identificar genes associados à resistência a essa praga. Os resultados gerados nesse projeto poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de defesa contra essa praga.

Material e Métodos

Os materiais e sua classificação quanto a resistência ou susceptibilidade a *S. frugiperda* estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição do material vegetal com a respectiva classificação de Resistência (R) e Susceptibilidade (S)

Tratamento	Material	Classificação	Tratamento	Material	Classificação
01	LR1	R	14	LS3	S
02	LR2	R	15	LS4	S
03	LR3	R	16	LS5	S
04	LR4	R	17	LS6	S
05	LR5	R	18	LS7	S
06	LR6	R	19	LS8	S
07	LR7	R	20	LS9	S
08	LR8	R	21	LS10	S
09	LR9	R	22	Z Chico	R
10	LR10	R	23	BR 3123	S
11	LR11	R	24	BR 201	S
12	LS1	S	25	L MP 705	R
13	LS2	S			

Foram utilizados para cada tratamento vinte e cinco materiais; três repetições e cinco plantas por vaso. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e a infestação realizada vinte e um dias após o plantio. Condução do experimento e características avaliadas: (1) Plantio dos materiais em vasos na casa de vegetação (7 sementes por vaso); (2) Irrigação com volume de água padronizado; (3)

Desbaste (5 plantas por vaso); (4) Infestação com *S. frugiperda* (10 lagartas/planta), utilizando-se pincel; (5) Medidas de altura de plantas (cm) (período infestação) e número de folhas (período infestação). Quatorze dias após a infestação foram descritas notas para os danos (escala visual), número de folhas, número de lagartas por vaso, peso de lagartas (mg), comprimento lagartas (mm) e largura casula cefálica (mm) O RNAm para produção da biblioteca de cDNA foi extraído de uma amostra composta de folhas de plantas resistentes a *S. frugiperda* e de outra amostra de plantas susceptíveis após a infestação. Para a extração direta do RNAm, utilizou-se o “Kit Quickprep micro RNAm purification” (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA) segundo as instruções do fabricante. Para a obtenção da biblioteca foi utilizado o PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, EUA) conforme instruções do fabricante. Esse processo foi inicialmente descrito por Diatchenko et al., 1996. O cDNA denominado *tester*, foi preparado a partir da população de RNAm obtida de folhas de genótipos de milho resistentes a *S. frugiperda* e o cDNA denominada *driver*, foi preparado a partir da população de RNAm das folhas de genótipos de milho susceptíveis ao patógeno. Após a confecção dos cDNAs *tester* e *driver* esses foram digeridos com RsaI separadamente para obtenção de moléculas curtas e de final abrupto. A população *tester* foi subdividida em duas alíquotas, sendo que uma ligada o adaptador 1 e a outra com o adaptador 2R, obtendo-se duas populações com diferentes adaptadores. O cDNA *driver* não recebeu adaptadores. Após as hidridizações foram feitas duas ampliações por PCR. Os produtos da segunda amplificação por PCR foram clonados no vetor TOPO TA 2.1, utilizando-se o “Kit TOPO TA Cloning for Sequencing” (Invitrogen). Após transformação bacteriana, Sambrook et al. (1989), o produto foi plaqueado em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina, onde haviam sido distribuídos 5 µL de IPTG 0,8 M e 50 µL de X-Gal 10 mg/mL. As colônias brancas obtidas foram inoculadas em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina. Para a extração dos plamídeos, foi utilizado o método de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989). Fez-se a digestão dos clones com a enzima de restrição *Eco* RI para verificar a presença, o tamanho dos insertos e a eficiência da digestão. Para a reação de seqüenciamento foram utilizados os iniciadores M13 R e F e as reações de seqüenciamento realizadas com o kit “Big Dye Terminator” v. 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as recomendações dos fabricantes e analisadas no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). Para análise dos clones foi retirado o vetor, as seqüências “*forward* e *reverse*” de cada clone foram alinhadas, utilizando-se o programa CAP3 (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>), obtendo-se uma seqüência consenso para cada clone. Comparou-se então com as seqüências depositadas no banco de dados “Genbank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o programa Blast N.

Resultados e Discussão

Conforme figura 1A, os RNA e mRNA obtidos tiveram alta qualidade devido a intensidade das bandas ribossomais de 18 e 28S. Apesar da baixa concentração do mRNA (ainda com presença de RNA ribossômicos) foi dado continuidade ao processo de subtração. Os cDNAs obtidos do produto de subtração foram clonados no vetor TOPO-TA e seqüenciados.

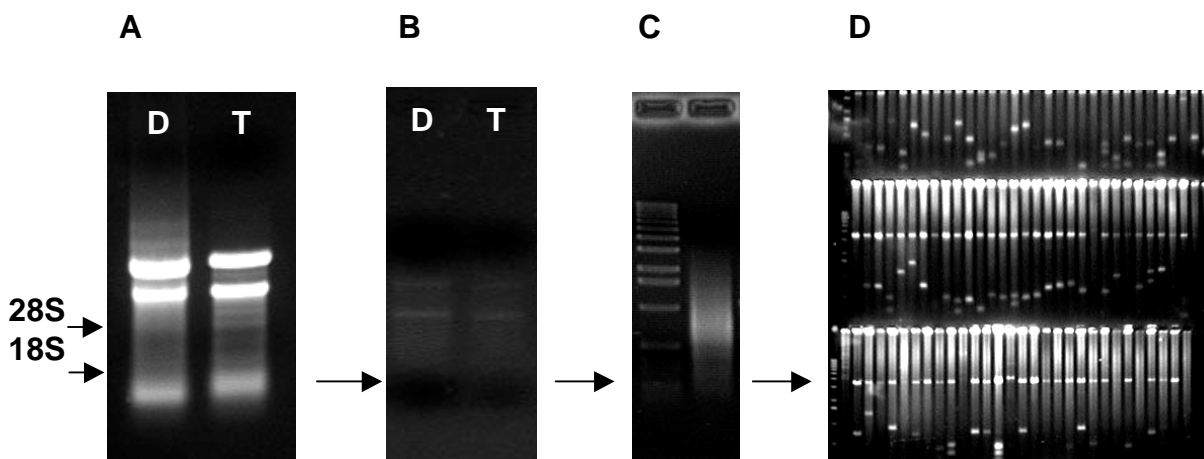


Figura 1 – Etapas da montagem da biblioteca subtrativa: A = RNA driver (D) e tester (T); B = mRNA driver (D) e tester (T); C = produto da segunda amplificação; D = amostragem da clonagem do produto de PCR no vetor TOPO-TA

Os resultados dos clones encontrados assim como a sua homologia com o banco de dados está descrito no tabela 1.

Tabela 1 – Descrição do genes encontrados na biblioteca subtrativa.

Descrição no Banco de Dados (GenBank)	Espécie	<i>e-value</i>	Número de clones
Aspartate Aminotransferase	<i>Panicum miliaceum</i>	2e-135	02
Cab-m7 gene para captação de luz	<i>Zea mays</i>	e-48	01
Celulose sintase-7 (CesA-7)	<i>Zea mays</i>	e-61	01
Cinamoil CoA redutase	<i>Zea mays</i>	9e-51	01

Cloroplasto rRNA-operon	<i>Zea mays</i>	8e-64	01
Disulfito isomerase (pdi)	<i>Zea mays</i>	e-59	01
Fator de alongação 1 alfa	<i>Zea mays</i>	0.0	10
Fator de transcrição / domínio MADS	<i>Gnetum gnemon</i>	1e-75	01
Ferredoxina	<i>Zea mays</i>	e-154	06
Fosfoenolpiruvato carboxilase	<i>Zea mays</i>	e-155	03
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	<i>Zea mays</i>	1e-87	01
Gliceraldeído-3-fosfato	<i>Zea mays</i>	e-178	01
Metalotioneína	<i>Zea mays</i>	2e-54	01
Piruvato ortofosfato diquinase	<i>Zea mays</i>	7e-46	01
Plastocianina	<i>Oryza sativa</i>	e-49	04
Proteína componente do fotosistema II	<i>Zea mays</i>	e-54	03
Proteína de choque térmico (HSP 70)	<i>Zea mays</i>	e-128	01
Proteína ligante a ácido nucleico (NBP)	<i>Zea mays</i>	0.0	02
S-adenosil-L-metionina sintetase	<i>Oryza sativa</i>	1e-50	01
Sequências codificadas encontradas em projetos de mapeamento	<i>Zea mays</i>		83
Tioredoxina	<i>Zea mays</i>	3e-48	01
Transportador de fosfato	<i>Zea mays</i>	e-134	01
Ubiquitina	<i>Zea mays</i>	e-146	01

Conclusão

Dentre os 400 clones sequenciados foram identificados os genes mostrados na tabela 1. As metalotioneínas são proteínas intracelulares que se ligam a metais de transição como cobre e zinco. Acredita-se que estejam envolvidas na detoxificação celular, além de vários outros processos relacionados a enzimas dependentes de metais (Borovanský, 1994). As plastocianinas são proteínas que contém cobre em sua constituição, estando envolvidas na fotossíntese. As tioredoxinas também fazem parte da fotossíntese e participam de várias vias regulatórias. Estudos preliminares da disulfito isomerase de brassica mostraram a sua contribuição na defesa da planta. Em trigo essa mesma enzima está relacionada em resposta ao fungo *Mycosphaerella graminicola* (Ray et al., 2003). O fator de transcrição *ngl9* é um MADS Box de genes expressos em alfalfa (Zuccherro e Dunn, 2001) e pode estar relacionado uma cascata de desenvolvimento. A confirmação da expressão diferencial nos genótipos resistentes em relação aos sensíveis a *S. frugiperda* está em andamento. Para aqueles que ser mostrarem

diferencialmente expressos será feito análises funcionais para elucidação dos mecanismos de resistência a *S. frugiperda* no milho e posteriormente na obtenção de plantas transgênicas resistentes a essa praga.

Referência Bibliográficas

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, (EMBRAPA/CNPMS, Circular Técnica, 21). 1995

GUIMARÃES, P.E. de O.; VIANA, P.A. Estudo da herança da resistência de genótipos de milho ao ataque da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Rel. Téc. Anual CNPMS, 1992-1993, p.201-202, 1994.

RAY S, ANDERSON JM, URMEEV FI, GOODWIN SB. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol*. 53(5):701-14. 2003

VIANA, P. A.; POTENZA, M. R. Avaliação de antibiose e não-preferência em cultivars de milho selecionados com resistência à lagarta-do-cartucho. *Bragantia*, v. 59, p. 27-33, 2000.

ZUCCHERO JC, CASPI M, DUNN K. ngl9: a third MADS box gene expressed in alfalfa root nodules. *Mol Plant Microbe Interact*. 14(12):1463-7. 2001