



ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES CANDIDATOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AO MÍLDIO EM VIDEIRA, PRESENTES NO *LOCUS Rpv3*.

ANDRIELE WAIRICH¹; JAIANA MALABARBA²; VANESSA BUFFON³; DIOGO DENARDI PORTO⁴; LUIS FERNANDO REVERS⁵

INTRODUÇÃO

Plasmopara viticola é um oomiceto que causa o míldio em videira. Esta doença tem grande impacto econômico nas regiões produtoras de uva, podendo causar grandes perdas de produção. O controle da doença necessita de inúmeras aplicações de fungicidas, gerando impacto ambiental e aumento do custo operacional de produção.

As cultivares da espécie *Vitis vinifera* são totalmente suscetíveis ao míldio enquanto que muitas cultivares, resultantes de hibridações com espécies norte-americanas e asiáticas, mostram nível variável de resistência ao *P. viticola*, o que permitiu o mapeamento de genes de resistência e *loci* de caracteres quantitativos (QTLs) (FISCHER et al., 2004; POLENASI et al., 2010). Os mecanismos de resistência ao míldio incluem o fortalecimento da parede celular e o disparo de mecanismos associados à síntese de proteínas *pathogenesis-related* (PR), compostos antimicrobianos (como fitoalexinas) e da montagem de respostas complexas como a reação de hipersensibilidade (RH), que resulta na morte celular programada em torno do sítio de infecção, bloqueando o avanço do patógeno (POLENASI et al., 2010).

Três *loci* com efeito na resistência ao míldio já foram identificados em videira: *Rpv1*, *Rpv2* e *Rpv3* (WELTER et al., 2007). O *locus Rpv3* está localizado na porção distal do cromossomo 18, região rica em genes TIR-NBS-LRR (BELIN et al., 2009) e o fenótipo associado a este *locus* é uma forte RH nos indivíduos resistentes. A RH envolve a ativação de vários genes R. A maioria dos genes R codificam proteínas que apresentam repetições ricas em leucina (LRRs), um sítio central de ligação de nucleotídeo (NBS) e um domínio variável N-terminal, composto por um domínio *coiled-coil* (CC) ou um domínio homólogo ao *Toll/Interleukin-1 Receptor* (TIR) (DRY et al., 2009).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar genes candidatos à resistência ao míldio no *locus Rpv3* de videira e avaliar o perfil transcricional destes genes por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em uma cultivar suscetível ao míldio ('Cabernet Sauvignon') e em uma

¹ Graduanda em Eng. Biopro. Biotecnologia. UERGS-RS, bolsista CNPQ, e-mail: andriwairich@hotmail.com

² Graduanda em Ciências Biológicas, Unisinos - RS, bolsista CNPQ, e-mail: jaianamalabarba@yahoo.com.br

³ Analista Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: vanessa@cnpuv.embrapa.br

⁴ Pós - Doutorado. UFRGS - RS, Bolsista CNPQ, e-mail: diogodp@cnpuv.embrapa.br

⁵ Pesquisador Embrapa Uva e Vinho-RS, e-mail: luis@cnpuv.embrapa.br

cultivar resistente ao míldio ('Villard Blanc') após desafio com uma suspensão de esporos de *P. viticola*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estacas de 'Villard Blanc' e 'Cabernet Sauvignon' foram coletadas e enraizadas. O inóculo de *P. viticola* foi obtido no campo, da cultivar Isabel e os esporos foram usados para o preparo de uma suspensão 3×10^5 esporos/mL⁻¹. A suspensão de esporos foi pulverizada na superfície abaxial das folhas de 'Villard Blanc' e 'Cabernet Sauvignon'. Dez folhas por replicata biológica foram coletadas em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até processamento. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em triplicata biológica, cada uma composta por uma caixa com 20 estacas enraizadas e sob condições ambientais controladas (umidade relativa de 100% e temperatura de 25°C), na Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves - RS (coordenadas geográficas: 29°10'15"S, 51°31'8"W, 690m de altitude).

O RNA total foi extraído de acordo com Reid (2006) e quantificado em espectrofotômetro. Uma alíquota de 1 µg de RNA total foi tratada com DNase e transcrita com kit comercial. O cDNA foi utilizado para a obtenção dos perfis transcricionais dos genes candidatos através de RT-qPCR usando SYBR Green como fluoróforo e Actina como gene referência (REID et al., 2006). As reações em triplicata técnica foram submetidas a 94°C por 10 min., seguidas de 40 ou 60 ciclos de 94°C por 15seg. e 60°C por 60seg. A análise da especificidade do produto de PCR foi realizada através de curva de dissociação. A eficiência das reações foi calculada a partir dos dados de amplificação usando LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). A expressão gênica relativa de cada gene foi calculada usando a equação de Pfaffl (PFAFFL, 2001). Iniciadores específicos foram desenhados para cada gene e analisados no OligoAnalyzer 3.1.

Para a escolha dos genes candidatos, aplicou-se o teste de Fisher, usando Blast2GO (GÖTZ et al., 2008), nos genes presentes na região distal do cromossomo 18 de (*locus Rpv3*) com o objetivo de buscar termos funcionais enriquecidos quando comparados a outras regiões aleatórias do genoma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o teste de Fisher, a região genômica do *locus Rpv3* é enriquecida com genes associados às respostas de defesa. Deste conjunto de genes, 40 possuem pelo menos um dos domínios TIR-NBS-LRR. Deste conjunto de genes preditos, 8 possuem os 3 domínios e foram selecionados para serem avaliados por RT-qPCR.

Dos oito pares de iniciadores utilizados, Vv18s0089g00100 e o Vv18s0041g02450 não apresentaram amplificação por RT-qPCR. Os pares de iniciadores Vv18s0089g00090,

Vv18s0089g02120 e o Vv18s0041g01620 apresentaram amplificação nas duas cultivares, enquanto que Vv18s0041g01330 e Vv18s0041g01340 apresentaram amplificação apenas na cultivar Villard Blanc e Vv18s0089g00600 apenas na cultivar Cabernet Sauvignon (Figura 1).

Os genes Vv18s0041g01330, Vv18s0089g00600 e Vv18s0089g02120 não mostraram diferença estatística em relação a 0 HAI. O gene Vv18s0041g01340 mostrou uma diminuição na expressão após a inoculação com *P. viticola* em ‘Villard Blanc’ com diferença significativa em 48 HAI. Os perfis transcricionais dos genes Vv18s0089g00090 e Vv18s0041g01620 mostraram um claro aumento de expressão nas duas cultivares após o tratamento. Na cultivar Villard Blanc em 6 e 12 HAI a diferença é estatisticamente significativa quando compara-se à 0 HAI (Figura 1).

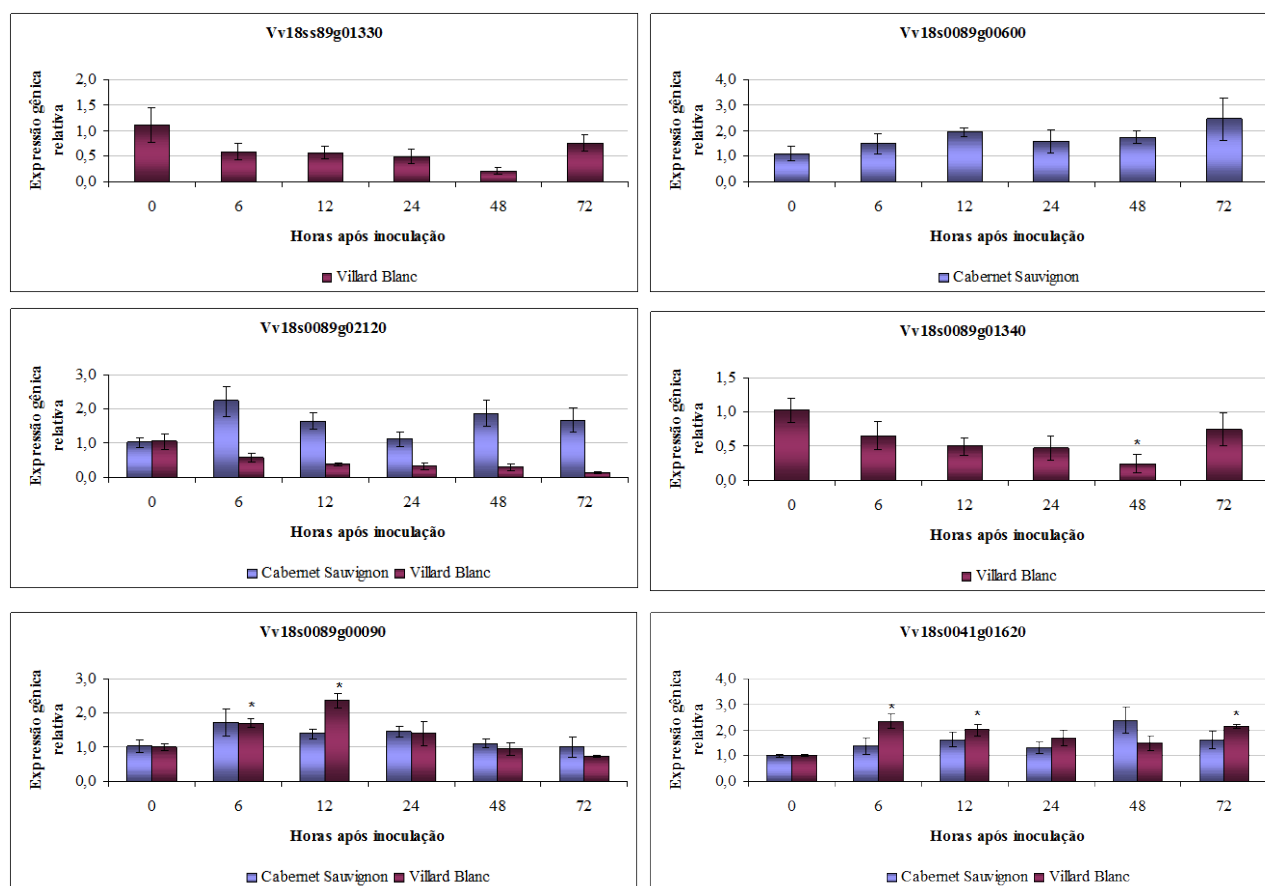


Figura 1 - Perfil transcricional dos genes candidatos obtidos por RT-qPCR após pulverização com míldio na cultivar suscetível Cabernet Sauvignon e na cultivar resistente Villard Blanc. Horas após a inoculação (HAI) estão representadas no eixo X e a expressão gênica relativa no eixo Y. Os dados de Actina foram usados para normalizar os dados de todos os genes e 0 HAI foi usado como calibrador. Todos os dados são representados como médias de 3 replicatas técnicas e 3 replicatas biológicas. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *t* ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A região genômica do *locus* Rpv3 na porção distal do cromossomo 18 é enriquecida com genes preditos associados às respostas de defesa. Os genes analisados mostraram perfil

transcricional diferencial após o tratamento de pulverização com *P. viticola* em ambas cultivares. A cultivar Villard Blanc apresentou perfis transcricionais mais contrastantes quando comparada com a cultivar Cabernet Sauvignon.

REFERÊNCIAS

- BELLIN, D.; PERESSOTI, E.; MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; ADAM-BLONDON, A. -F.; CIPRIANI, G.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R.; GASPERO, G. DI. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 163-176, 2009.
- DRY, I. B.; FEECHAN, C. ANDERSON; JERMAKOW, A. M.; BOUQUET, A.; ADAM-BLONDON, A. -F.; THOMAS, M. R. Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, p. 94-105, 2010.
- FISCHER, B. M.; SALAKHUTDINOV, I.; AKKURT, M.; EIBACH, R.; EDWARDS, K. J.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E. M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 501-515, 2004.
- GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 3420-3435, 2008.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. e45, 2001.
- POLENASI, M.; ET AL General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species, **BMC Genomics**, v.11, p. 117-132, 2010.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.
- REID, K.E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; TLUND, S.T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC Plant Biology**, v. 6, p. 27-37, 2006.
- WELTER, L. J.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N.; AKKURT, M.; MAUL, E.; EIBACH, R.; TÖPFER, R.; ZYPRIAN, E. M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding**, v. 20, p. 354-379.