

Validação de um sistema para estudo funcional de genes de *Phakopsora pachyrhizi* baseado em silenciamento gênico

CRUZ, B. G.¹; YOKOYAMA, A.²; RINCÃO, M. P.²; CARVALHO, K.³; KAMOGAE, M. K.⁴; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. M.⁵;

¹Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL)- Bolsista CNPq/PIBIC, Embrapa Soja, Londrina, Paraná.

²Universidade Estadual de Londrina - Embrapa Soja, Londrina, Paraná. ³Pós doutorando/CNPq,

Embrapa Soja, Londrina, Paraná.⁴Analista, Embrapa Soja, Londrina, Paraná.⁵Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, Paraná. e-mail: biaanca_guimaraes@hotmail.com

Introdução

O fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja (FAS), é um fungo biotrófico obrigatório, necessitando obter todos nutrientes necessários para o crescimento através do parasitismo de células do hospedeiro. A infecção da planta hospedeira inicia-se com a germinação do esporo, seguida da formação do apressório e penetração direta pela epiderme. As hifas crescem no espaço intercelular, e cerca de 24-48 horas após a infecção (hai), formam uma estrutura altamente especializada em associação com as células do mesófilo do hospedeiro, chamada de haustório. O haustório representa o ponto de contato mais íntimo entre o patógeno e a planta hospedeira, tendo papel fundamental na interação patógeno-hospedeiro. Cerca de 7 a 9

dias após a germinação do esporo, é possível observar a formação das urédias com a liberação de novos esporos (uredosporos) (MARCHETTI, et al., 1975). Após a infecção, as plantas podem reconhecer e ativar dois tipos de respostas de resistência: PTI (PTI do inglês – *PAMP-triggered immunity*), inespecífica e eficaz para a maioria dos patógenos não especializados, ou ETI (ETI do inglês – *Effector-triggered immunity*), ativada por hospedeiros especializados e capazes de produzir e secretar proteínas efetoras e/ou de (a)virulência no interior das células do hospedeiro que são reconhecidas por receptores específicos, os genes de resistência (R) cognatos. ETI resulta em uma forte resposta de resistência, que, na maioria das vezes, culmina na morte da célula hospedeira localizada e sistêmica sinalização de defesa.

A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de defesa das plantas a fitopatógenos, tanto PTI como ETI, é de fundamental importância, assim como a compreensão das estratégias destes patógenos para penetrar, colonizar e causar doença, permitindo a identificação de rotas/genes essenciais para a virulência e patogenicidade. Devido à elevada variabilidade do patógeno e o elevado impacto na cultura da soja, o estudo de genes essenciais, fatores de avirulência envolvidos na patogenicidade de *P. pachyrhizi* tem ganhado elevada importância. Para estudos funcionais, estratégias moleculares que permitam a obtenção de indivíduos mutantes, seja pela disrupção, inativação ou substituição de sequências gênicas de interesse a nível de DNA, são as mais comuns, mas partem da necessidade de um sistema de transformação genica eficiente, o que ainda é ineficiente em organismos biotróficos. Alternativamente, metodologias de silenciamento gênico pós transcricional (PTGS) têm sido empregadas atualmente com sucesso para o estudo da função de genes. O PTGS constitui um processo celular que leva à degradação específica de mRNAs ou o bloqueio da tradução, impedindo que a informação genética seja expressa. O processo é desencadeado pela presença, no citoplasma, de moléculas de RNA fita dupla, conhecidas como dsRNA (*double stranded RNA*), pela transcrição de microRNAs endógenos, ou mesmo pelo desbalanço nos níveis de um determinado

mRNA (BARBOSA et al., 2004). Uma vez presente no citoplasma, estas moléculas de RNA dupla fita são reconhecidas por proteínas DICER, que atuam como helicases e nucleases de modo que são clivadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 21-25 nucleotídeos, chamados de siRNAs (*small interfering RNA*). O siRNAs tem suas fitas separadas e uma delas é incorporada a um complexo protéico chamado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), que irá utilizar a seqüência contida no siRNA como guia, degradando ou bloqueando a tradução do mRNA presente no citoplasma que possua similaridade de seqüência com o siRNA, ou seja, que tenha a seqüência complementar a do siRNA (BARBOSA et al., 2004).

Este processo molecular foi descrito apenas em eucariotos, sendo caracterizado em varias espécies de nematoides, insetos, plantas, animais e fungos. Nos fungos, a maquinaria de PTGS já foi descrita em várias espécies dos filos Ascomycota e Basidiomycota, tais como as espécies *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans*, dentre outras (NUNES et al., 2011). Especificamente para Basidiomicetos, no subfilo Ustilaginomycota que inclui *P. pachyrhizi*, a presença dessa maquinaria foi identificada em duas espécies, *Malassezia globosa* e *Ustilagomaydis* (NUNES et al., 2011).

Até o momento ainda é relativamente pequeno o número de trabalhos demonstrando a possibilidade do emprego do PTGS como ferramenta para o estudo funcional de genes de fungos biotróficos. Essa hipótese foi testada para o fungo *Blumeria graminis*, em cevada e trigo carregando RNA fita dupla ou RNA anti-senso similar ao gene Avra10 do fungo. O silenciamento levou a redução do desenvolvimento do fungo, indicando que siRNAs ou dsRNAs foram capazes de serem transportados da célula de cevada e trigo para a célula do fungo, levando ao silenciamento do gene alvo no patógeno (NOWARA et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença da maquinaria de silenciamento gênico pós transcricional no genoma do fungo *P.*

pachyrhizi e otimizar os protocolos de inoculação e detecção de dsRNA nos tecidos do patógeno através de testes iniciais com dsRNA similar ao gene GFP (*Green fluorescence protein*).

Material e métodos

1. Identificação de componentes da maquinaria de silenciamento gênico

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja. Inicialmente a ferramenta BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi realizado contra um Banco de Dados Local da Embrapa Soja, contendo cerca de 36 mil ESTs de *P. pachyrhizi*, utilizando sequência de genes já descritos em outros fungos como componentes da maquinaria de silenciamento gênico. Esta busca inicial foi realizada com o objetivo de encontrar sequências similares a estes genes no genoma de *P. pachyrhizi*. Para a realização do BLAST foram utilizadas as sequências das proteínas EFP86699 , EFP85158, EFP76866 e EFP90910 de *Puccinia graminis*, disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information), referentes à proteínas essenciais que compõem a maquinaria de silenciamento: DICER, argonauta, exportina e RNase T2, respectivamente.

2. Padronização da administração e detecção do dsRNA-GFP nos tecidos do hospedeiro

Uma molécula de dsRNA similar ao gene GFP foi gentilmente cedida pelo Dr. Eduardo Chumbinho, bem como os *primers* específicos capazes de serem utilizados para a detecção destas moléculas nos tecidos do hospedeiro e patógeno (GFP 1 e 2, e qGFP 1 e 2) .

Com o objetivo de avaliar a melhor forma de administração do dsRNA, aspersão ou microgotas, folhas de soja do genótipo suscetível CD 219 RR foram coletadas, lavadas e deixadas de repouso por uma hora em água destilada. Após o repouso, as folhas foram inoculadas com 800 μ L da solução para inoculação na concentração de 300 ng de dsRNA-GFP por μ L de água destilada (BAILEY et al., 2010). Para a inoculação por aspersão, as folhas foram borrifadas duas vezes (cerca de 200 μ L

por folha) em bandejas e posteriormente transferidas para placas de petri contendo agar a 1%. A inoculação via microgotas (cerca de 40 μL do dsRNA-GFP por folha) foi aplicada diretamente sobre a folha, com auxílio de uma pipeta automática P20 uL, em placa de petri contendo ágar 1%. As placas foram deixadas durante 48 horas em câmara climatizada. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

Após o período de 48 horas, as folhas foram lavadas quatro vezes para remover todo o dsRNA da superfície foliar e garantir que qualquer detecção observada após a reação de PCR seria específica para o dsRNA-GFP que foi absorvido pela folha de soja. As águas utilizadas na lavagem também foram submetidas à reação de PCR para a detecção do dsRNA. Depois da lavagem, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido para a extração de RNA. O RNA total foi extraído com o Kit RNeasy Plant Mini Kit, segundo as recomendações indicadas pelo fabricante.

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 12,5 μL por reação, utilizando 1 μL do RNA total extraído, mais 6,1 μL de água miliQ, 1,2 μL tampão 10x, 1,0 μL MgCl_2 (50 mM), 1,0 μL dNTP (10 μM), 2 μL de primer (1 μL do forward e 1 μL do reverse) (5 mM) e 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL). A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador com temperatura de desnaturação das fitas à 94°C por 1 min, anelamento dos primers à 62°C por 1 min, e extensão das fitas à 72°C por 1 min, em 35 ciclos de amplificação. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1%, e as imagens foram capturadas através do sistema de imagens Lpix.

3. Permanência dos dsRNA-GFP nos tecidos do hospedeiro

A fim de avaliar a estabilidade e disponibilidade do dsRNA-GFP nos tecidos do hospedeiro, o dsRNA-GFP foi administrado em folhas do genótipo CD 219 RR por ser suscetível à ferrugem, via microgotas, utilizando a mesma concentração de dsRNA-GFP, conforme descrito anteriormente. A detecção da presença do dsRNA-GFP foi conduzida

após 24, 48, 72, 96, e 192 horas da administração. Após a coleta, as folhas foram submetidas à quatro lavagens em água destilada e armazenadas à -80°C até o momento da extração. Após todas as coletas as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido para extração do RNA total com o auxílio do mesmo kit de extração de RNA citado anteriormente. O dsRNA-GFP foi detectado mediante PCR convencional conforme descrito no experimento 2. A detecção do dsRNA-GFP em cada tempo foi avaliada em triplicata.

4. Detecção do dsRNA-GFP nos tecidos do patógeno

A detecção de dsRNA-GFP em esporos foi realizada de duas maneiras, utilizando duas soluções de inoculação distintas: uma solução foi preparada e deixada overnight durante 16 horas (BAILEY et al., 2010), e outra preparada no momento da inoculação. Ambas as soluções foram preparadas na concentração de 300 ng de dsRNA-GFP por μL de água destilada, contendo 0,04% de Tween e 104 esporos.mL⁻¹. Folhas de soja do genótipo BRS 360, suscetível à ferrugem, foram lavadas e deixadas de repouso por uma hora em água destilada, sendo posteriormente inoculadas por meio de microgotas, diretamente em placas de petri contendo agar 1%. As folhas foram mantidas em câmara climatizada durante 14 dias, até que o ciclo de infecção do fungo se tornasse completo, permitindo a formação das estruturas reprodutivas do fungo e a esporulação. Para cada tratamento foram utilizadas 16 folhas.

A coleta dos esporos do fungo foi realizada a vácuo e extração do RNA total foi conduzida utilizando o Kit de extração de RNA RNeasy Plant Mini Kit. O dsRNA-GFP foi detectado mediante a PCR convencional utilizando o conjunto de *primers* qGFP 2. A reação de PCR foi realizada com um volume total de 12,5 μL por reação, sendo nas mesmas concentrações dos reagentes descritos anteriormente. A amplificação dos fragmentos também foi realizada à 94°C por 1min, com anelamento à 63°C por 1 min, e extensão das fitas a 72°C por 1 min, com 35 ciclos de amplificação. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1%, e as imagens foram capturadas através do sistema de imagens Lpix.

Resultados e discussão

O BLAST realizado utilizando as sequências de *P. graminis* possibilitou a identificação de sequências similares em *P. pachyrhizi* depositadas no Banco Local de ferrugem da Embrapa Soja, sendo obtidos valores de E-value entre $3e-28$ e 146 , e identidade acima de 60%, indicando a potencial presença destes genes também no genoma de *P. pachyrhizi*. Os testes de especificidade realizados com os quatro pares de *primers* possibilitaram a seleção de dois conjuntos de primers para a detecção de dsRNA de GFP, um para detecção em folha (GFP 2), e um para detecção em esporo (qGFP 2). Os resultados obtidos permitiram confirmar a absorção de dsRNA através da superfície foliar, assim como sua permanência no tecido durante os principais tempos de infecção da planta pelo fungo (24, 48, 72, 96 e 192 horas), conforme observado na Figura 1 (1A e 1B). Os resultados permitiu observar que ambos os métodos de inoculação, aspersão e microgotas, foram eficientes em folhas de soja, permitindo a absorção da molécula de dsRNA. Aparentemente, mesmo utilizando uma quantidade menor de dsRNA, a administração via microgotas parece ter proporcionado maior absorção, considerando que uma mesma quantidade de RNA foi utilizado em ambas as reações. Assim, como a inoculação por microgotas utiliza um menor volume de solução por folhas, este método foi escolhido para ser empregado nos experimentos seguintes.

A detecção de dsRNA-GFP em esporos de *P. pachyrhizi* oriundos de um ciclo de reprodução em folhas de soja também foi obtida com sucesso, sendo detectado o fragmento esperado correspondente ao dsRNA-GFP (Figura 2). Porém, somente a solução preparada no momento da inoculação foi eficiente para causar a doença nas folhas inoculadas, resultando na produção dos esporos testados. A solução preparada e deixada há 16 horas *overnight* não causou nenhum sintoma da doença nas folhas inoculadas.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos foi possível confirmar presença de genes similares à maquinaria de silenciamento pós transcricional

no genoma *P. pachyrhizi*, uma vez que sequências similares foram encontradas no banco de dados Local de ferrugem com elevado nível de confiança. No entanto, os experimentos conduzidos neste trabalho não nos permite ainda afirmar que esta maquinaria é funcional. Em relação ao método de inoculação, ambas as formas de administração foram eficientes na absorção de dsRNA em folhas de soja, mas a de microgotas apresentou maior vantagem quando comparada á inoculação por aspersão. Este trabalho também permitiu concluir que folhas de soja são capazes de absorver moléculas de dsRNA através da superfície foliar, e que estas moléculas podem permanecer disponíveis e estáveis no tecido vegetal por pelo menos 192 horas após a inoculação. Por fim, assim como o observado para as folhas de soja, os esporos do fungo *P. pachyrhizi* são também capazes de absorver moléculas de dsRNA diretamente da solução bem como terem sido transferidas pela planta hospedeira. Estes resultados demonstram que a utilização dessa maquinaria de silenciamento gênico pode constituir uma ferramenta aplicável e viável no estudo do patossistema soja - *P. pachyrhizi*.

Referências

BAILEY, A. M.; NIBLETT, C. **Bioassay for gene silencing**. U.S. n.2010/0257634 A1. 7 Oct. 2010.

BARBOSA, A. S.; LIN, C. J. Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 5, p. 612-619, 2004.

MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Phytopathology**, v. 65, p. 822-823, 1975 .

NOWARA, D.; GAY, A.; LACOMME, C.; SHAW, J.; RIDOUT, C.; DOUCHKOV, D.; HENSEL, G.; KUMLEHN, J.; SCHWEIZER, P. HIGGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. **The Plant Cell Online**, v. 22, n. 9, p. 3130-3141, 2010.

NUNES, C. C.; SAILSBERY, J. K.; DEAN, R. A. Characterization and application of small RNAs and RNA silencing mechanisms in fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p. 172-180, 2011.

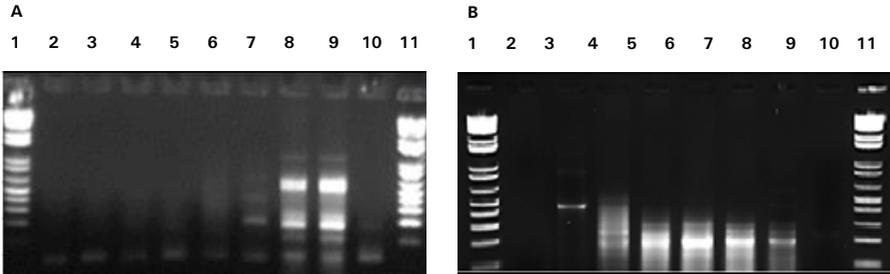


Figura 1: Detecção de dsRNA-GFP via PCR convencional. (A) Detecção de dsRNA-GFP após 48 horas de administração em folhas de soja via aspersão e microgotas – (1 e 11) Marcador 1 Kb plus Invitrogen; (2-5) água utilizada nas 4 lavagens das folhas; (6) DNA de soja; (7) DNA de esporo; (8) amostras de soja inoculadas por aspersão (9) amostras de soja inoculadas por microgotas (10) controle negativo. B) Permanência do dsRNA-GFP em folha de soja. (1 e 10) Marcador 1 Kb plus Invitrogen; (2) DNA de soja; (3) dsRNA intacto; (4-8) amostras de soja inoculadas coletadas em 24, 48, 72, 96 e 192 horas após administração do dsRNA-GFP respectivamente; (9) Controle negativo.

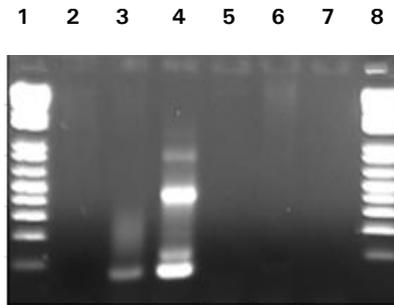


Figura 2: Detecção de dsRNA de GFP em esporo de *P. pachyrhizi* - (1 e 8) Marcador 1 Kb plus Invitrogen; (2) DNA de soja; (3) RNA de esporo com dsRNA de GFP; (4) Produto de PCR de dsRNA de GFP; (5 e 6) Amostras de DNA de esporos; (7) Controle negativo.