

Análise quantitativa da expressão do gene *GmHSP 17.6-L* em linhagens de soja resistentes e suscetíveis ao nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*

Renata Fuganti^{1,2}; M. F. P. da S. Machado¹; A. M. R. Morales^{2,3}; S. R. R. Marin²; Waldir Pereira Dias²; João Flávio Veloso Silva²; Carlos Alberto Arrabal Arias²; José Renato Bouças Farias²; Alexandre Lima Nepomuceno². ¹UEM - Universidade Estadual de Maringá, rfuganti@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja; ³UNESP/FCAV - Jaboticabal.

Introdução

A produção mundial de soja cresceu, de 1970 a 2003, cerca de 333%, passando de 43,7 para 189,2 milhões de toneladas. Em 2004, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de soja, atrás dos EUA, e à frente da Argentina, com uma produção de 50 milhões de toneladas ou 25% da safra mundial, estimada em 216 milhões de toneladas (Conab, 2005; Embrapa, 2006).

No entanto, alguns fatores diminuem a produtividade da cultura, destacando-se as doenças causadas pelos nematóides fitoparasitas, em especial os nematóides de galhas, do gênero *Meloidogyne*. Os prejuízos anuais na produção mundial causados por estes patógenos são estimados em 11% devido à redução da quantidade de grãos colhidos e o aumento dos gastos com medidas de controle e defensivos agrícolas (Barker, 1998).

No entanto, o método de controle mais eficiente, prático e economicamente viável ao produtor é o uso de cultivares resistentes (Ferraz, 2001). Assim, trabalhos de pesquisas visando identificar genes expressos durante a relação parasitária de nematóides e a seleção de genes de resistência a *M. javanica* são desejáveis para aprimoramento e obtenção de genótipos resistentes a estes fitopatógenos, sendo esta uma das principais metas dos programas de melhoramento.

Em trabalhos anteriores uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular com provável função de chaperona molecular foi identificada em genótipos de soja resistentes e suscetíveis ao *M. javanica*. O sequenciamento da região promotora do gene *Gmhsp 17.6-L* (nº de acesso no *Genbank* M11317) em materiais resistentes e suscetíveis apresentou diferenças, onde uma maior inserção de repetições AT(n) foi observada nos indivíduos resistentes (Fuganti et al., 2004). Um ensaio de proteção de ribonuclease foi feito visando determinar se a inserção/deleção estaria causando inativação gênica em um dos genótipos. No entanto, foi observado que ambos genótipos apresentam expressão do gene *Gmhsp17.6-L* em tratamentos inoculado e não inoculado com o fitoparasita.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar quantitativamente a expressão do gene *Gmhsp17.6-L*, visando identificar se o tamanho da inserção poderia estar alterando os níveis de expressão da proteína e isto estar relacionado com a resistência/suscetibilidade ao nematóide.

Materiais e Métodos

Utilizando a técnica de PCR em tempo real, linhagens de soja resistentes (genótipo PI595099) e suscetíveis (cultivar BRS133) ao nematóide de galhas *M. javanica*, e uma amostra de indivíduos resistentes (JF7002, JF7027 e JF7056) e suscetíveis (256-S, 259-S e 266-S) resultante deste cruzamento foram analisados quanto à expressão do gene *Gmhsp 17.6-L*. As sementes foram colocadas para germinar em câmara de germinação e após 7 dias as plântulas foram transferidas para casa de vegetação. Em tubetes de plástico, os materiais foram inoculados com juvenis do nematóide, na concentração de aproximadamente 650 J₂ por planta.

As coletas de material biológico foram feitas após 1, 3 e 6 dias de inoculação. Raízes das plantas nos tratamentos inoculado e não inoculado de todos os materiais foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. RNA total foi extraído, utilizando o reagente Trizol conforme instruções do fabricante. Em seguida foi feita a síntese de cDNA, para a análise de PCR em tempo real, utilizando primers oligodT. Para confirmação da presença do nematóide, amostras de raízes foram coradas com fucsina ácida, observadas em lupa e fotografadas.

Uma curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA visando determinar a concentração ideal para o PCR em tempo real. As reações de PCR para quantificação relativa foram preparadas em triplicatas utilizando um bulk de cDNAs dos três dias de coleta de raízes nos tratamentos inoculado e não inoculado, para as diferentes amostras testadas. O gene rRNA 18S (nº de acesso no *Genbank* XO2623.1) foi utilizado como controle endógeno. Todas as análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se o software SDS (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA). Para análise dos parentais, a expressão do parental resistente PI595099 não inoculado, (valor 1) foi utilizado como calibrador e para a análise da população o calibrador utilizado foi a amostra resistente JF7056 não inoculado (valor 1).

Resultados e Discussão

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.

Os resultados demonstram que comparando-se as amostras resistentes e suscetíveis, o gene possui maior expressão nos genótipos resistentes inoculados, tanto para os parentais (Gráfico 1) como para a população (Gráfico 2).

Estes resultados sugerem, portanto, que a presença das repetições AT(n) na região promotora do gene *Gmhsp17.6-L* pode de alguma forma favorecer uma maior expressão desta proteína na presença do nematóide e uma vez que chaperonas moleculares participam de processos celulares que promovem a proteção da célula em situações de estresse, este mecanismo pode estar relacionado com a maior/ menor resistência a nematóides.

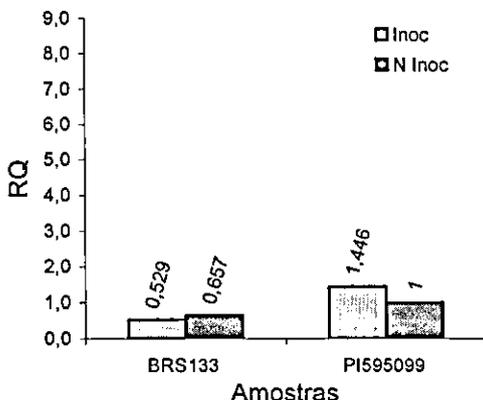


Gráfico 1. Quantificação relativa do gene *Gmhsp 17.6-L* para os parentais suscetível, BRS133 e resistente, PI595099, nos tratamentos inoculado e não inoculado com juvenis do nematóide *M. javanica*. . O cdNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coletas após a inoculação com juvenis do nematóide.

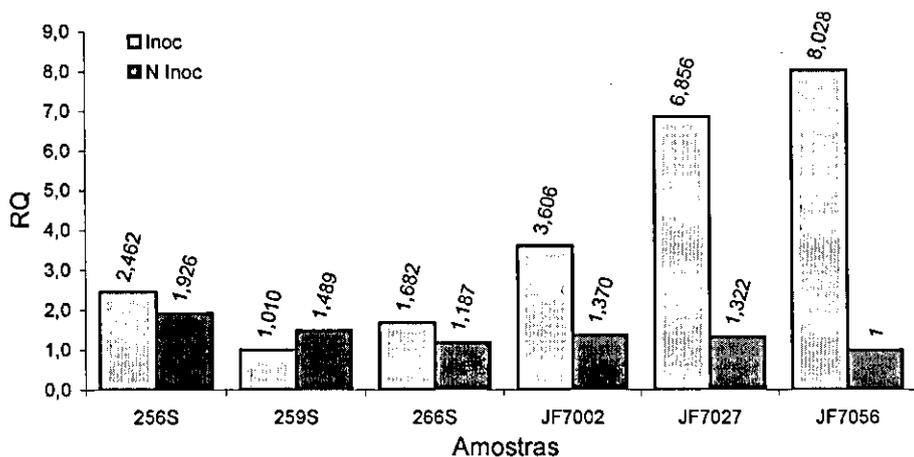


Gráfico 2. Quantificação relativa do gene *Gmhsp 17.6-L* para os indivíduos suscetíveis (256S, 259S e 266S) e indivíduos resistentes (JF7002, JF7027 e JF7056), da população resultante do cruzamento BRS133 x PI595099, nos tratamentos inoculado e não inoculado com juvenis do nematóide *M. javanica*. . O cdNA utilizado nas reações consistia em bulks das três datas de coletas após a inoculação com juvenis do nematóide.

Referências

BARKER, K. R. Introduction. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A. e WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. Madison: American Society of Agronomy, p. 1-20, 1998.

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> 2006. 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.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Microsatellite insertion in a heat shock protein promoter region (Gmhsp 17.6-L) in soybean plants resistant and susceptible to *Meloidogyne javanica*. In: **VII World Soybean Research Conference - IV International Soybean Processing and Utilization Conference- III Brazilian Soybean Congress, 2004, Foz do Iguaçu- PR. Proceedings of VII World Soybean Research Conference - IV International Soybean Processing and Utilization Conference- III Brazilian Soybean Congress, 2004.**