

ISOLAMENTO DE RNA PARA O ESTUDO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE FRUTOS DE MAÇÃS E *Botryosphaeria dothidea*

Andréia Hansen Oster; Marcelo Gravina de Moraes; Rosa Maria Valdebenito Sanhueza; Adriana Corrent; Renar João Bender

INTRODUÇÃO

A maçã representa uma das mais importantes espécies de frutos de clima temperado comercializadas no mundo. Por outro lado, *Botryosphaeria dothidea* é o agente causal da podridão branca, uma das mais importantes doenças pós-colheita em maçãs. O estabelecimento da infecção é o resultado de uma complexa interação entre o hospedeiro e o patógeno, envolvendo processos desencadeados no fungo, tais como, a ativação de mecanismos para penetração e colonização do tecido hospedeiro, e na planta, tais como, ativação das respostas de defesa da planta. Estas se constituem de uma ampla variedade de barreiras e mecanismos de defesa já existentes, ou ainda, mecanismos de defesa que, aparentemente, permanecem inativos, expressando-se, após as plantas serem expostas a agentes de indução (Benito et al. 1996; Lurie, 1998).

O possível aparecimento de raças resistentes, bem como, a maior preocupação do consumidor com a presença de resíduos químicos, pela utilização de agrotóxicos, tem levado ao desenvolvimento de novas técnicas para o controle desta doença. No caso de *B. dothidea*, são escassos os estudos sobre técnicas alternativas para o controle deste patógeno na pós-colheita de maçãs, bem como, são inexistentes as informações sobre as bases bioquímicas e moleculares desta interação.

As técnicas mais promissoras, utilizadas para o controle de *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* na pós-colheita são a termoterapia com calor, a utilização de cloreto de cálcio e o controle biológico com microorganismos antagonistas (Conway et al, 1999). Em adição ao possível efeito letal do calor ao patógeno, vários trabalhos têm demonstrado que a termoterapia com calor pode ser efetiva na redução da doença através da indução de mecanismos de defesa (Lurie, 1998). Segundo Pavoncello et al. (2001), dois grupos de proteínas podem ser ativados pelo tratamento térmico com água, as quais induziriam a resistência no fruto: proteínas de choque de calor (HSPs) e proteínas relacionadas com a patogênese (PRs).

Uma das técnicas utilizadas para a identificação de genes que são regulados durante as interações planta-patógeno é o Differential Display (DD) RT-PCR. Para isto, há necessidade do isolamento de RNA purificado dos tecidos da planta e/ou patógeno. Diversos protocolos já foram descritos para o isolamento de RNA de tecidos vegetais (Thompson et al., 1983; Verwoerd et al., 1989), porém, sem sucesso na utilização com tecidos que apresentam altas quantidades de polissacarídeos e compostos fenólicos, tais como frutos de maçã. López-Gómez & Gómez-Lim (1992) desenvolveram um método para extração de RNA de frutos de manga baseado no uso de tris-ácido bórico e precipitação com etanol 20%. Utilizando dois protocolos de isolamento, este trabalho teve como objetivo isolar o RNA total de frutos de maçã inoculadas ou não com o patógeno *Botryosphaeria dothidea* após termoterapia com calor, além de verificar a expressão de genes que são regulados durante a interação maçã-*B. dothidea* através da utilização de DD/RT-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de conídios, o isolado de *B. dothidea*, obtido a partir de maçãs cv. Fuji, foi repicado em discos de papel filtro que estavam sobre o meio de cultura BDA nas placas de Petri, permanecendo por

15 dias a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro foram retirados das placas e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de meio de cultura batata-dextrose (BD) estéril a 5%. A concentração de conídios na suspensão foi determinada com um hemacitômetro e ajustada para 10⁶ conídios/ml. As maçãs 'Fuji' foram inoculadas com o patógeno através da aspersão, durante 5 segundos, da suspensão de conídios, na região equatorial do fruto. Imediatamente após a inoculação, tanto os frutos inoculados quanto os não inoculados foram acondicionados em bandejas plásticas e incubados em câmara de crescimento BOD a 26°C por 48 horas. Após este período, parte dos frutos recebeu a aplicação de calor, através da aspersão de água quente a 58°C por 30 segundos. Após 24 e 72 horas da aplicação dos tratamentos, as amostras (discos de 1 cm de diâmetro x 0,5 cm de profundidade) de tecidos foram retiradas da região equatorial das maçãs. Os discos foram colocados em tubos de microcentrífugas e imediatamente armazenados em ultrafreezer a -80°C.

O isolamento de RNA total foi realizado através de dois protocolos. O protocolo de isolamento de RNA de tecidos vegetais utilizados pelo LFM - UFRGS está baseado nos procedimentos padrões recomendados por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações na tentativa de se obter uma quantidade adequada de RNA: a) a quantidade de amostra utilizada foi maior (400 mg) com o volume dos reagentes duplicados; b) para a ressuspensão do RNA foi utilizado 40 µl de água ultra pura. O outro protocolo de isolamento de RNA utilizado foi segundo López-Gómez e Gómez-Lim (1992).

A análise da expressão dos genes, realizada através de Differential Display -RT-PCR, utilizou para a síntese da primeira fita de cDNA: 2,3 µL contendo 5 µg de RNA; 1 µL de tampão (5X) (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂); 0,17 µL de mix deoxinucleotídeos (10mM cada); 0,33 µL de DTT (0,1M); 0,33 µL de dTA (5'AAGCTTTTTTTTTTTTA3') ou dTC (5'AAGCTTTTTTTTTTTC3') ou dTG (5'AAGCTTTTTTTTTTTTG3') (20 µM) (três combinações de iniciadores); 0,17 µL da enzima MMLV transcriptase reversa (Amersham Life Science); 0,7 µL de água ultra pura para completar o volume de 5 µL de cada amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas por uma hora a 37°C. Para a amplificação foram adicionados os seguintes componentes: 5 µL de tampão (10X) para PCR (200mM de Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl); 2 µL de MgCl₂ (50mM); 1 µL de mix deoxinucleotídeos (10mM cada); 2 µL de dTA (5'AAGCTTTTTTTTTTTTA3') ou dTC (5'AAGCTTTTTTTTTTTC3') ou dTG (5'AAGCTTTTTTTTTTTTG3') (20 µM); 2 µL de oligo 3 (5'AAGCTTCGGCATA3'); 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades/µL); 5 µL de cDNA da reação anterior; 32,7 µL de água ultra pura. As condições da reação de PCR foram: 95°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 90 segundos e 72°C por 5 minutos, num total de 39 ciclos.

A concentração de RNA total foi estimada por espectrofotometria a 260nm e a qualidade do RNA através das razões A260 / A280. A integridade do RNA e os produtos das reações de PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% - TBE 1,0X (Tris 400mM pH , ácido bórico 400mM, EDTA 10mM), utilizando-se brometo de etídio (0,5 µg/mL⁻¹) para visualização do mesmo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de RNA total por grama de tecido de maçã variou de 20-30µg/g de tecido fresco. O método de isolamento utilizando o protocolo do LFM - UFRGS produziu maior quantidade de RNA total (30µg/g tecido fresco), porém, ainda assim, valor considerado baixo. A razão de absorbância A260 / A280 foi igual a 1,8. Quando utilizado o protocolo segundo López-Gómez e Gómez-Lim (1992), recomendado para a

extração de RNA de frutos, tanto a produção de RNA total (20µg/g de tecido fresco) como a razão A260 / A280 foi baixa (1,6), mesmo com duas precipitações adicionais com LiCl. Estes resultados diferem dos obtidos por aqueles autores quando da extração de RNA total de mesocarpo de manga, onde obtiveram 60-70µg RNA/g de tecido fresco.

Por outro lado, Valderrama-Cháirez et al. (2002) trabalhando com extração de RNA em cactus, utilizando este mesmo protocolo, obtiveram uma baixa produção (30µg RNA/g tecido fresco). Além da baixa produção de RNA verificada nos dois protocolos, as razões de absorvância A260 / A280 apresentaram valores que indicam contaminação das amostras com proteínas ou ainda, polissacarídeos e compostos fenólicos (Asif et al. 2000). O isolamento de RNA de boa qualidade parece ser difícil em tecidos que apresentam altas quantidades de polissacarídeos e compostos fenólicos, tais como frutos de maçã, pêra e banana (Hu et al., 2002). A presença destas substâncias poderia afetar a qualidade e quantidade do RNA isolado.

Durante a fase de amadurecimento de frutos, o amido insolúvel é transformado em polissacarídeos solúveis, os quais, apresentam propriedades físico-químicas semelhantes aquelas do RNA e poderiam co-precipitar e contaminar o RNA durante a extração e, conseqüentemente, afetar a produção e a qualidade do mesmo (Asif et al., 2000). Estas características poderiam explicar a baixa produção do RNA observada nos dois protocolos testados.

O isolamento do RNA utilizando o protocolo segundo López-Gómez e Gómez-Lim (1992) não apresentou bandas de RNA ribossomal, quando analisado em gel de agarose, sugerindo que o RNA foi degradado durante as extrações (Figura 1B). No caso do isolamento de RNA pelo método do LFM - Ufrgs (Figura 1A), a análise por eletroforese com gel de agarose mostrou, em todas as linhas, duas bandas distintas correspondendo a 28S e 15S do RNA ribossomal.

Para qualquer método de isolamento de RNA adotado neste trabalho não foi possível a visualização de bandas nos géis de agarose. Os resultados obtidos no RT-PCR evidenciam que os protocolos utilizados não produziram RNA de alta qualidade e desta forma inviabilizam a transcrição reversa e, conseqüentemente, a análise da expressão diferencial dos genes em frutos de maçã.

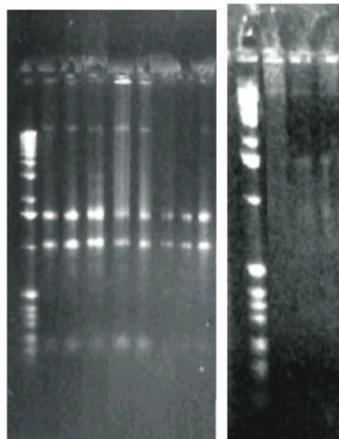


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de epiderme + polpa de maçã 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. (A) Amostras de RNA extraídas segundo o protocolo LFM-UFRGS (B) Amostras de RNA extraídas segundo López-Gómez & Gómez-Lim (1992). Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASIF, M. H. et al. A simple procedure for isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v. 18, p. 109-115, 2000.
- BENITO, E.P., PRINS, T.W. and VAN KAN, J.A.L. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant fungus interaction. **Plant Molecular Biology**, v. 32, P. 947-957, 1996.
- CONWAY, W.S.; JANISIEWICZ, W.J.; KLEIN, J.D. et al. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **HortScience**, Alexandria, v.34, n.4, p.700-704, 1999.
- HU, C. G. et al. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 69, 2002.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R.; GÓMEZ-LIM, M. A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **HortScience**, v. 27, n. 5, p. 440-442, 1992.
- LURIE, S. Postharvest heat treatments of horticultural crops. **Horticultural Reviews**, v. 22, p. 91-121, 1998.
- PAVONCELLO, D. et al. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 17-22, 2001.
- THOMPSON et al. Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves. **Planta**, n. 158, p. 487-500, 1983.
- VALDERRAMA-CHÁIREZ, M. L. et al. Isolation of functional RNA from cactus fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 279-286, 2002.
- VERWOERD, T. C.; DEKKER, B. M. M.; HOEKEMA, A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 6, p. 2362, 1989.