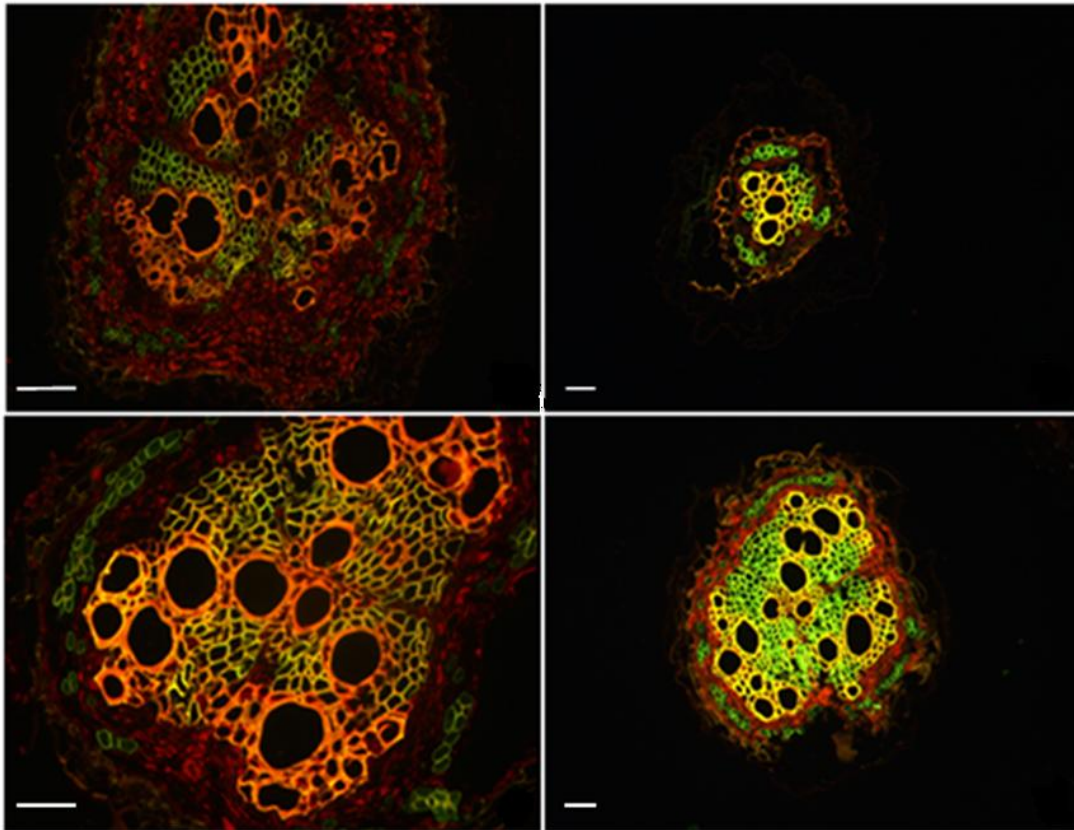


Análise por hibridização in situ da expressão de metalotioneínas em *Arachis stenosperma* após inoculação com *Meloigogyne arenaria* (Nematoda)



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 223

**Análise por hibridização in situ da expressão
de metalotioneínas em *Arachis stenosperma*
após inoculação com *Meloigogyne arenaria*
(Nematoda)**

Pedro Ítalo Tanno Silva
Simone Ribeiro
Karina Proit
Patrícia M. Guimarães
Soraya C. M. Leal- Bertoli
David Bertoli
Regina Carneiro
Ana Cláudia Guerra Araújo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros:

Diva Maria de Alencar Dusi

Luiz Adriano Maia Cordeiro

José Roberto de Alencar Moreira

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Suplentes:

João Batista Tavares da Silva

Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Figura capa: Micrografias de secções transversais de raízes de *A. stenosperma* inoculadas (c e d) e não inoculadas (a e b) com *M. arenaria* raça 1 incubadas com laranja de acridina para confirmar a integridade da amostra e preservação do RNA no tecido (em verde) em microscopia de epifluorescência. Barras = 50µm

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 532 *Análise por hibridização in situ da expressão de metalotioneínas em Arachis stenosperma após inoculação com Melogogyne arenaria (Nematoda). / Pedro Ítalo Tanno Silva ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.*
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 223).

1. Nematóide. 2. Amedoim. I. Silva, Pedro Ítalo Tanno. II. Série.

633.368 – CDD 21

©Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Materiais e Métodos	8
Resultados	9
Agradecimentos	10
Referências	10

Análise por hibridização in situ da expressão de metalotioneínas em *Arachis stenosperma* após inoculação com *Meloigogyne arenaria* (Nematoda)

*Pedro Ítalo Tanno Silva*¹
*Simone Ribeiro*²
*Karina Proite*³
*Patrícia M. Guimarães*⁴
*Soraya C. M. Leal- Bertioli*⁵
*David Bertioli*⁶
*Regina Carneiro*⁷
*Ana Cláudia Guerra Araújo*⁸

Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma espécie de grande importância nas regiões semi-áridas dos trópicos, porém altamente susceptível a diversos fatores bióticos e abióticos, para os quais algumas espécies silvestres são resistentes ou tolerantes. Dentre os fatores bióticos, o nematóide de galha *Meloigogyne arenaria* é responsável pela diminuição do crescimento e até morte prematura da planta, ocasionando perdas na produtividade. Estudos anteriores avaliando a expressão diferencial de genes após inoculação com *M. arenaria* raça 1 por meio de RT-PCR e Northern Blot indicaram que o gene da metalotioneína do tipo 2 (AS2) tem sua expressão reduzida enquanto que o da metalotioneína do tipo 3 (AS5) aumenta em plantas de *A. stenosperma*. Estes genes estão possivelmente associados aos mecanismos de defesa nesta planta, que é resistente a infecção. Neste trabalho foi avaliada a distribuição espacial e temporal da expressão desses dois genes em secções de raízes de plantas de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* por meio de hibridização in situ utilizando sondas de RNA. As análises corroboraram a expressão diferencial desses dois genes em tecido radicular. Entretanto, a implicação dessa regulação gênica diferencial no processo de resistência a infecção não está definida.

PALAVRAS-CHAVE: expressão diferencial, nematóide de galha, hibridização in situ, metalotioneína

¹ Graduando em Eng. Florestal, Universidade de Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: pedroitalo.tanno@gmail.com

² PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: simone@cenargen.embrapa.br

³ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: kproite@gmail.com

⁴ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: messenbe@cenargen.embrapa.br

⁵ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: soraya@cenargen.embrapa.br

⁶ PhD. Universidade Católica de Brasília, email: david@pos.ucb.br

⁷ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: rcar@cenargen.embrapa.br

⁸ PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, email: guerra@cenargen.embrapa.br

Abstract

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of the most important oilseed crops in semi-arid regions, but it is very susceptible to different biotic and abiotic stresses, which some wild species are resistant or tolerant. The root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* is responsible for stunted plant growth or even premature plant death, resulting in loss of productivity. Previous studies by RT-PCR and Northern Blot showed gene differential expression after nematode inoculation, suggesting up-regulation of metallothionein type 2 gene (AS2) and down-regulation of metallothionein type 3 (AS5) in *A. stenosperma*. These genes are potentially related to the pathogenesis defence process in this resistant species. The present study shows the spatial and temporal expression of these two genes in root sections of *A. stenosperma* in response to *M. arenaria* race 1 inoculation by *in situ* hybridization using RNA probes. The analyses corroborated the differential expression of these two genes in *A. stenosperma*. However, the role of the differential regulation during the resistance process is yet unknown.

KEY WORDS: differential expression, root knot nematode, *in situ* hybridization, metallothionein

Introdução

O amendoim, *Arachis hypogaea* L., está entre as oleaginosas mais cultivadas no mundo, ocupando a 4ª posição dentre as mais produzidas, sendo superado apenas pela soja, canola e algodão (USDA, 2008). Devido ao seu grande valor energético e nutricional, o amendoim é importante matéria-prima para a indústria alimentícia (farelo para ração animal, extração de óleo e para consumo humano), além de produtos medicinais.

Diferentemente das outras espécies que pertencem ao gênero, a espécie cultivada é tetraplóide com dois genomas ($2n=4x=40$, genoma AABB), tendo surgido provavelmente de um cruzamento eventual entre duas espécies silvestres diplóides, *A. duranensis* (genoma AA) e *A. ipaënsis* (genoma BB), que sofreu duplicação do número de cromossomos, formando assim um híbrido tetraplóide fértil (VALLS e SIMPSON, 2005; SEIJO et al, 2007). Possivelmente, devido a esse isolamento reprodutivo, *A. hypogaea* apresenta uma base genética estreita quando consideradas características de interesse agrônomo. Já as espécies silvestres apresentam maior variabilidade genética, sendo então uma importante fonte de genes associados à resistência e tolerância a estresses bióticos e abióticos (FÁVERO e SUASSUNA, 2007).

Um dos maiores responsáveis pela perda de produtividade, crescimento reduzido e morte prematura de plantas de amendoim é a infecção pelo nematóide de galha *Meloidogyne arenaria* raça 1. Genes associados à resistência foram encontrados apenas nos cultivares NemaTam e COAN de *A. hypogaea* (SIMPSON, 1991), sendo portanto essencial a identificação de novos mecanismos de defesa e o desenvolvimento de novas variedades resistentes, uma vez que o uso de nematicidas é economicamente inviável e ambientalmente prejudicial.

Para tal, estudos envolvendo análises da expressão gênica vêm sendo conduzidos visando identificar e caracterizar genes associados à resistência a *M. arenaria* em *Arachis* silvestres. Bibliotecas de cDNA contendo genes diferencialmente expressos foram obtidas a partir de plantas de *A. hypogaea* e *A. stenosperma*, susceptível e resistente, respectivamente. Estudos comparativos dessas bibliotecas e análises histopatológicas confirmaram que o mecanismo de resistência à infecção se dá por reação de hipersensibilidade (HR) (PROITE, 2007).

Vários genes relacionados à defesa foram identificados nos ESTs (Expressed Sequence Tags) da biblioteca de cDNA de *A. stenosperma* infectada. Por meio de Northern Blot, RT-PCR e análises in silico, foi observado que algumas dessas seqüências apresentavam expressão diferencial durante o processo de infecção na espécie resistente (Fig. 1), sugerindo que estes genes estão potencialmente associados ao processo de resistência a esse patógeno (PROITE, 2007). Dentre esses genes com expressão diferencial, dois foram selecionados para caracterização mais detalhada do perfil de expressão utilizando hibridização in situ: o primeiro que apresentou identidade com a metalotioneína do tipo 3 (AS5 – contig 874), e outro com identidade a metalotioneína do tipo 2 (AS2 – contig 154).

Metalotioneína é uma família de proteínas envolvidas com a proteção contra os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (ROS), atuando como agentes antioxidantes (INÁCIO, 2006).

Para compreendermos melhor os mecanismos de resistência à *M. arenaria* em *Arachis*, a distribuição espacial e temporal da expressão de AS2 e AS5 foi analisada em secções de raízes de plantas de *A. stenosperma* inoculadas e não-inoculadas com nematóides da galha por meio de hibridização in situ.

Materiais e Métodos

Raízes de cinco plantas de *A. stenosperma* germinadas 90 dias antes foram inoculadas com 5.000 indivíduos de *M. arenaria* raça 1 em estágio de desenvolvimento juvenil 2 (J2). As plantas foram mantidas em casa de vegetação juntamente com outras cinco plantas controle (não inoculadas) e a irrigação iniciada três dias após inoculação, com água estéril.

A porção central de várias raízes de uma planta inoculada e outra planta controle foi coletada 2, 4, 9 ou 16 dias após a inoculação (DAI). As amostras foram fixadas em solução de tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 6,8 contendo 0,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído por 24h a 4°C. Após desidratação em solução aquosa de etanol em concentrações crescentes (30% a 100%) durante dois dias a 4°C, as amostras foram lentamente infiltradas com resina de metacrilato (butil metil metacrilato) por 3-4 dias a 4°C. Amostras foram colocadas em microtubos e polimerizadas a -20°C, sob luz UV por 24h. Secções semi-finas com 2,5-4µm de espessura foram obtidas e montadas sobre lâminas Probe On Plus® (Fisher Scientific # 15-188-52).

Para verificar a integridade da secção e conservação do RNA no tecido, uma lâmina de cada material foi tratada com acetona para remoção da resina e corada com tampão acetato 0,05%, pH 2,1 contendo laranja de acridina, que se liga a ácidos nucleicos. Estas secções foram observadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axiophot com iluminação ultravioleta (faixa de comprimento de 395 nm e 510 nm) e imagens com amostras contendo fluorescência verde, que correspondiam a presença de RNA, foram adquiridas utilizando o *software* AxioVision.

As seqüências selecionadas dos contigs 154 e 874 foram amplificadas por PCR e clonadas com o kit pGEM-T Easy (Promega, #A1360). Med-preps foram preparadas e os clones linearizados com enzima de restrição *SSTI* ou *SSTII*. As sondas senso e anti-senso dos clones linearizados foram obtidas a partir da transcrição in vitro utilizando as RNA polimerases T7 e SP6 e o kit DIG-RNA Labeling (Roche #11 175 025 910), onde moléculas de digoxigenina foram adicionadas durante a síntese.

Após remoção da resina das secções e desidratação das amostras utilizando soluções de etanol em concentrações crescentes, as lâminas foram hibridizadas com as sondas de RNA (2ng/µl de solução de hibridização) por 12h a 42°C em câmara úmida. Os sítios de hibridização foram detectados em microscópio epifluorescente por reação imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-digoxigenina associado a enzima fosfatase alcalina. Após a imunoreação, as amostras foram incubadas com BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3'*

indolyphosphate p toluidine salt/nitro-blue tetrazolium chloride) por 6h em ambiente escuro. Após lavagem em tampão Tris EDTA, as lâminas foram montadas em glicerol para observação.

Resultados

A integridade das secções e preservação de RNA nelas foi comprovada por meio da coloração com laranja de acridina e observação em microscopia de fluorescência (Fig. 2). Portanto, as demais amostras puderam ser utilizadas para detecção dos transcritos dos genes selecionados por hibridização in situ.

As raízes coletadas 2 e 4 DAI não apresentaram sinal evidente após hibridização com nenhuma das duas sondas testadas (não mostrada), tanto nas amostras de planta inoculada quanto na controle.

Após hibridização com a sonda AS2, o sinal observado foi mais intenso e freqüente nas amostras não-inoculadas do que naquelas inoculadas. O nível de expressão detectado nas raízes coletadas 9 e 16 DAI e hibridizadas com AS2 foi similar (Figura 3).

O sinal de hibridização após incubação com a sonda AS5 foi detectado tanto nas raízes de plantas inoculadas quanto nas não-inoculadas. Entretanto, o sinal foi mais intenso e freqüente no primeiro grupo (Figura 4). O nível de expressão detectado nas raízes coletadas 9 e 16 DAI e hibridizadas com AS5 foi similar.

Discussão

A técnica de hibridização em secções de tecidos permite determinar a distribuição espacial e temporal de transcritos de genes específicos, permitindo uma avaliação mais detalhada do seu perfil de expressão e regulação. Essas análises auxiliam na elucidação do papel desses genes no processo de resposta de defesa de plantas contra doenças, sendo assim uma importante ferramenta em estudos de genômica funcional. A identificação e caracterização de genes de resistência em *A. stenopserma* ao nematóide de galha *M. arenaria* vem sendo buscadas com o objetivo de trazer mais informações sobre função e regulação de genes candidatos durante o processo de infecção.

Análises realizadas anteriormente indicaram uma expressão diferencial de genes do tipo metalotioneínas em *A. stenopserma* inoculadas com *M. arenaria* raça 1. Resultados da hibridização in situ confirmaram a ocorrência de expressão diferencial desses genes do tipo metalotioneína.

Metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular (4-7 kDa), ricas em cisteína (Cys), e que desempenham um papel importante na proteção contra os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (ROS), atuando como agentes antioxidantes (INÁCIO, 2006). A função biológica das metalotioneínas envolve detoxificação e homeostase de metais, representando uma resposta específica de exposição a metais como zinco e cádmio, podendo estar envolvidas em reações de hipersensibilidade (HR)

e respostas de defesa a fatores bióticos e abióticos. As metalotioneínas também estão envolvidas no “seqüestro” de ROS, protegendo o tecido. Acredita-se que a metalotioneína do tipo 2 em *A. stenosperma* atua como um sequestrador de ROS, e sua diminuição de expressão em resposta ao patógeno pode estar associada à supressão de mecanismos de desintoxicação, que conseqüentemente resulta em morte celular no sítio de alimentação do nematóide, impedindo assim um desenvolvimento maior do patógeno (PROITE, 2007). A metalotioneína do tipo 3, possivelmente está relacionada à desintoxicação de metais com o objetivo de prevenir mutações.

Portanto, as análises por hibridização in situ corroboraram a expressão diferencial dos genes *AS 2* e *AS 5* em raízes de plantas da espécie selvagem *A. stenosperma* após inoculação por *M. arenaria* raça 1. Entretanto, a implicação dessa regulação gênica diferencial no processo de resistência ainda não está esclarecida. Outros estudos estão em andamento para definir o papel desses genes no processo de resistência.

Agradecimentos

Generation Challenge Program TL1.

Referências

- FÁVERO, A. P.; SUASSUNA, T. F. **Obtenção de três eventos-elite através da hibridação entre *A. hypogaea* e anfidiplóides sintéticos e sua inserção no programa de melhoramento da Embrapa.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 165).
- INÁCIO, F. A. **Metalotioneína e metais em *Geophagus brasiliensis* – acará.** 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.
- PROITE, K. **Busca de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao Nematóide das Galhas (*Meloidogyne arenaria*).** 2007. 213 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- SEIJO, G. J.; LAVIA, G. I.; FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A.; DUCASSE, D. A.; BERTIOLI, D. J.; MOSCONE, E. A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. **American Journal of Botany**, Bronx, N. Y., v. 94, p. 1963-1971, 2007.
- SIMPSON, C. E. Pathways for introgression of pest resistance into *Arachis hypogaea* L. **Peanut Science**, Raleigh, US, v. 18, p. 22-26, 1991.
- UNITED STATES. Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. **Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA.** (Circular Series, novembro, 2008). Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: nov. 2008.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, Corrientes, Argentina, v. 14, n. 1-2, p. 35-63, 2005.

FIGURAS

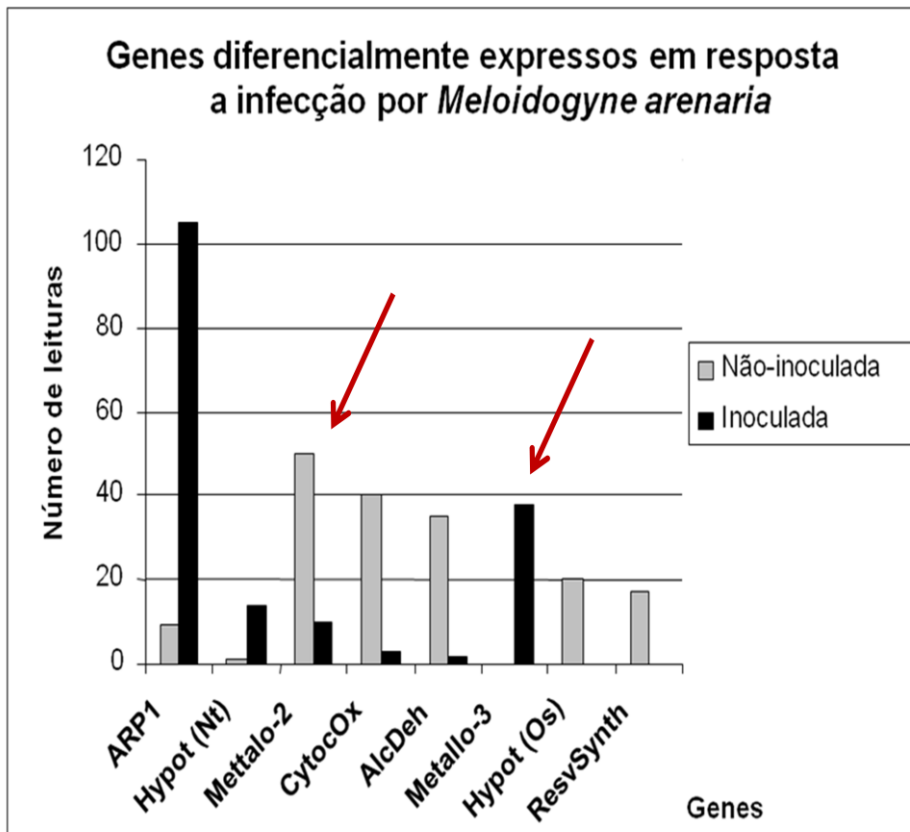


Figura 1: ESTs diferencialmente expressos das bibliotecas de cDNA de raiz de *A. stenosperma* infectada com *M. arenaria* analisadas por Fisher ($p < 0,005$). ARP1 – *Auxin Repressed Protein*, Hypot(Nt) – Proteína hipotética com identidade com proteína hipotética de *Nicotiana tabacum*, Mettalo-2 – Metalotioneína do tipo 2, CytocOx – citocinina-oxidase hidrogenase, AlcDeh – álcool desidrogenase, Mettalo-3 – metalotioneína do tipo 3, Hypot(Os) – Proteína hipotética com identidade com proteína hipotética de *Oryza sativa*, ResvSynth – resveratrol sintase.

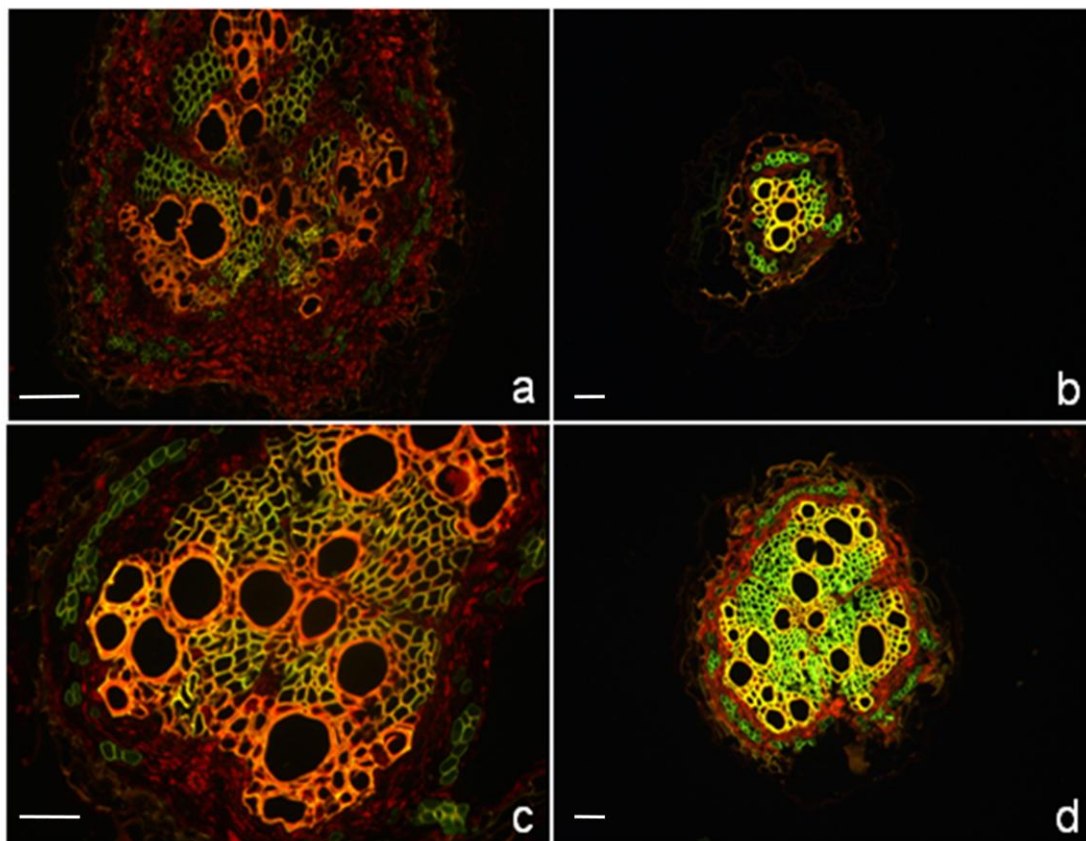


Figura 2: Micrografias de secções transversais de raízes de *A. stenosperma* inoculadas (c e d) e não inoculadas (a e b) com *M. arenaria* raça 1 incubadas com laranja de acridina para confirmar a integridade da amostra e preservação do RNA no tecido (em verde) em microscopia de epifluorescência. Barras = 50µm

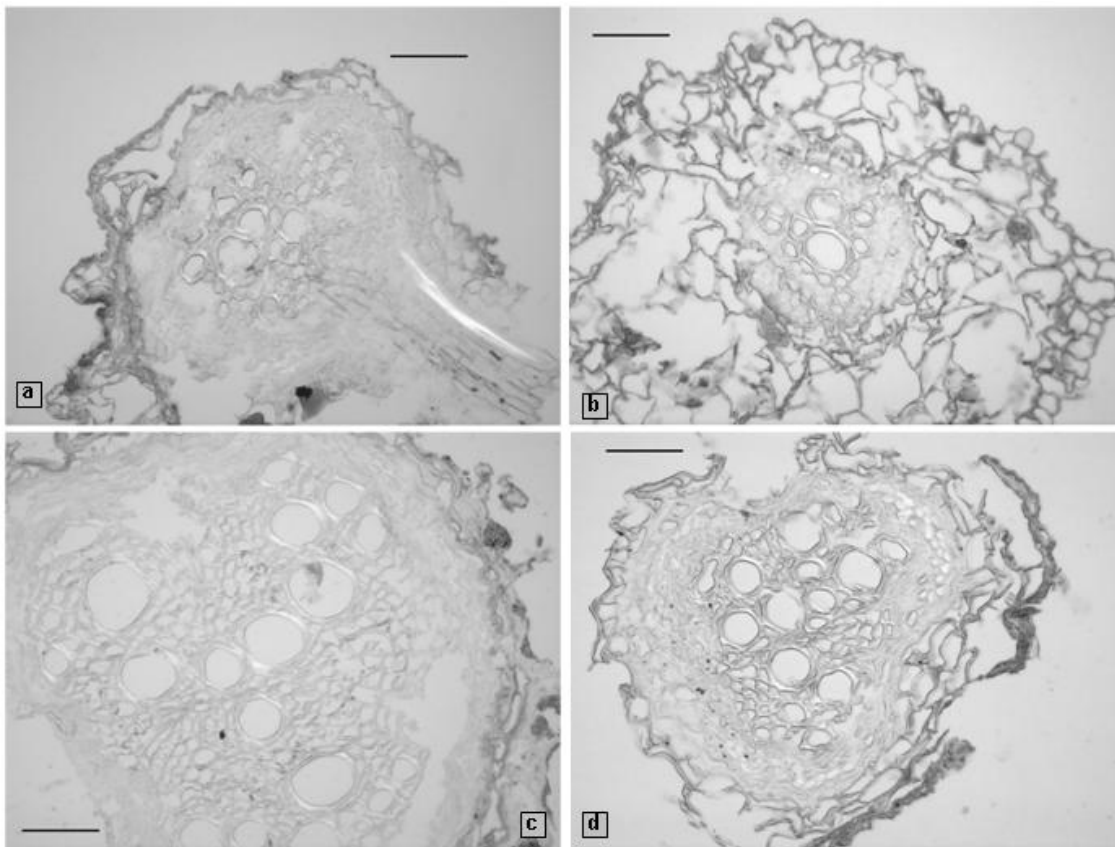


Figura 3: Micrografias de secções de raízes não inoculadas de *A. stenosperma* (a, c) e inoculadas e coletadas 9 DAI (b) e 16 DAI (d) hibridizadas com sonda de RNA AS2 (metalotioneína do tipo 2). Barras = 50 μ m.

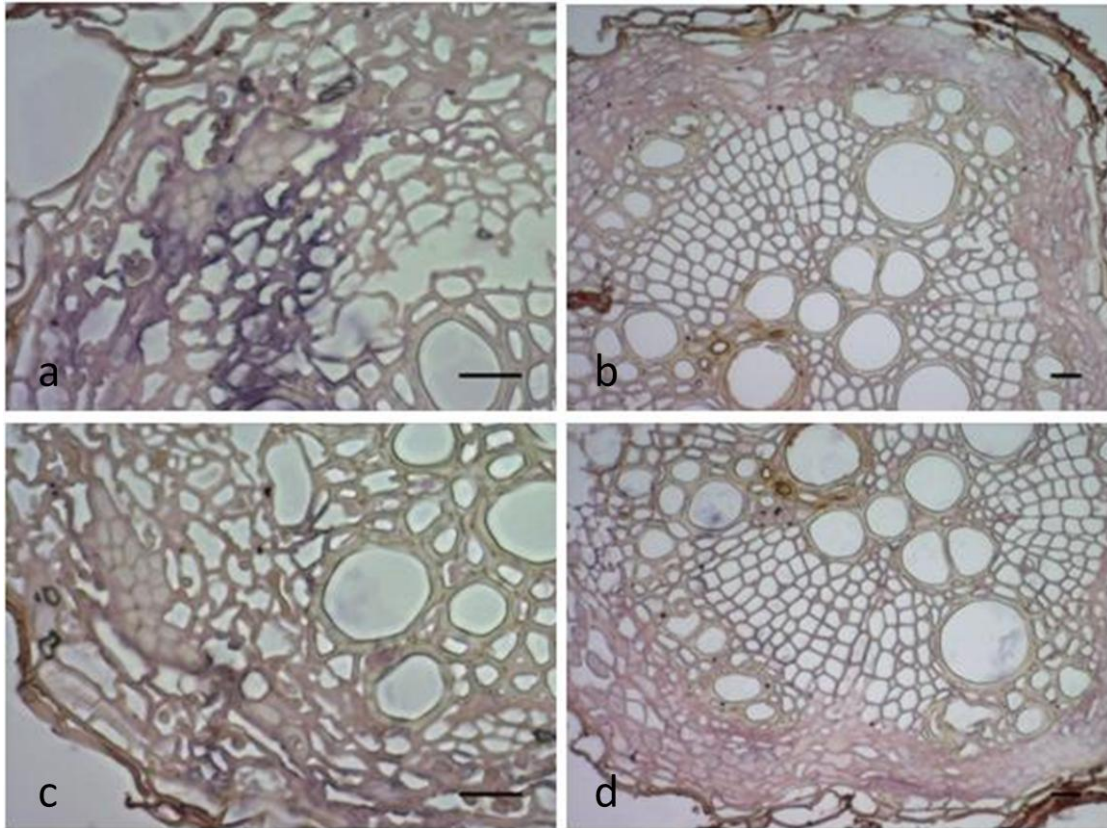


Figura 4: Micrografias de secções de raízes não inoculadas de *A. stenosperma* (a, c) e inoculadas e coletadas 9 DAI (d) e 16 DAI (b) hibridizadas com sonda de RNA AS 5 (metalotioneína do tipo 3). Barras = 20 μ m.