



<http://dx.doi.org/10.12702/VIII.SimposFloresta.2014.89-591-1>

Obtenção de genes diferencialmente expressos em clones de *Eucalyptus grandis* inoculados com isolado de *Ceratocystis fimbriata*

Ariadne Marques¹, Viviane F. Anjos¹, Janaína F. Gonçalves¹, Marcelo L. de Laia¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (ariadne.marqs@hotmail.com; vivianefernandes123@hotmail.com; gonferja@yahoo.com.br; marcelolaia@gmail.com)

Resumo: Tendo-se em vista a importância econômica das espécies do gênero *Eucalyptus* e o difícil controle da murcha de *Ceratocystis*, o presente estudo teve por objetivo obter genes diferencialmente expressos em clones de *Eucalyptus grandis* inoculados com isolado de *Ceratocystis fimbriata* mediante a construção de bibliotecas de cDNA obtidas por meio de hibridação subtrativa supressiva. Ao final do processo foi possível obter fragmentos de cDNA diferencialmente expressos que compõe a biblioteca de interesse. Em um próximo passo, esses genes poderão ser sequenciados e caracterizados, a fim de se conhecer quais deles estão envolvidos no processo de resistência ao patógeno no genótipo resistente.

Palavras-chave: Bibliotecas de cDNA; Biotecnologia; Estresse; Expressão gênica; Fitopatologia.

1. Introdução

O *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted é um fitopatógeno vascular de ampla distribuição geográfica e com uma gama de hospedeiros, dentre eles espécies do gênero *Eucalyptus*, nas quais causa a murcha de *Ceratocystis*.

Atualmente, o emprego de genótipos resistentes tem se mostrado a forma mais eficiente de controle da doença. No entanto, os mecanismos de resistência do eucalipto à murcha por *Ceratocystis* ainda são desconhecidos, assim como o controle genético desse caráter. Pois, a existência de diferentes níveis de agressividade entre isolados e diferentes níveis de resistência entre clones, pode

dificultar a seleção de material resistente em Programas de Melhoramento (ZAUZA et al., 2004; OLIVEIRA, 2010; MAFIA et al., 2011).

Assim, a caracterização de genes ou locos que controlam esse caráter pode ser uma ferramenta de fundamental importância no processo de seleção de material genético resistente a esta doença.

Dentre as diversas técnicas de biotecnologia disponíveis para a prospecção de genes, tem-se a construção de bibliotecas de cDNA obtidas por meio de hibridação subtrativa supressiva (SSH). Essa técnica permite identificar os genes que estão sendo expressos somente em um dado genótipo, comparado a outro, ou em uma dada condição, também comparada à outra (NADEL et al., 2009).

Assim, o presente estudo teve por objetivo construir uma Biblioteca Subtrativa Supressiva de cDNA contendo genes diferencialmente expressos no caule de dois clones de *Eucalyptus grandis* considerados resistente e suscetível a murcha de *Ceratocystis*, ambos submetidos à infecção causada por este fungo.

2. Material e Métodos

O estudo foi realizado utilizando-se 40 mudas de dois clones de *Eucalyptus grandis* gentilmente cedidos pela Suzano Papel e Celulose S/A. Destas 20 pertenciam a um clone classificado como resistente (R) e 20 a um clone classificado como suscetível (S) à murcha de *Ceratocystis*. Sendo que, dez mudas de cada clone foram utilizadas como controle, sendo inoculadas com 2 mL de água destilada autoclavada. E, dez foram inoculadas com uma suspensão fúngica, obtida a partir do isolado UFVJM012, segundo a metodologia descrita por Laia, Alfenas e Harrington (2000).

Trinta dias após a inoculação os caules das mudas foram coletados, mediante um corte rente ao substrato e outro 10 cm a cima do ponto de inoculação, imediatamente acondicionados em um recipiente com nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80 °C até o momento da extração de RNA total.

O processo de obtenção dos genes diferencialmente expressos mediante a construção da Biblioteca subtrativa de cDNA iniciou-se com a extração de RNA total (RNAs mensageiros, ribossomais e de transferência) das amostras de caule resistente e suscetível, com inoculação fúngica, com o auxílio do conjunto de

reagentes PureLink Plant RNA Reagent, conforme as recomendações do fabricante (Life Technologies).

Ao fim do processo, a qualidade do RNA total extraído de cada amostra foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA), em cuba horizontal, corado com 2 µL brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

As amostras de RNA total foram submetidas a um processo de purificação, onde o RNA mensageiro (mRNA) foi isolado usando o conjunto de reagentes Nucleo Trap mRNA, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (MACHEREY-NAGEL).

As amostras de mRNA obtidas no processo de purificação foram usadas para síntese de DNA complementar ao mRNA (cDNA) com o auxílio do conjunto de reagentes PCR-Select cDNA Subtraction Kit seguindo as instruções do fabricante (Clontech).

A amostra obtida ao final desse processo compõe a biblioteca subtrativa supressiva com genes diferencialmente expressos no genótipo resistente ao *Ceratomyces*. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C.

3. Resultados e Discussão

A análise qualitativa das amostras por eletroforese em gel de agarose (1%) permitiu a visualização de duas bandas de rRNA nas amostras, rRNA 28S e o rRNA 18S (FIGURA 1).

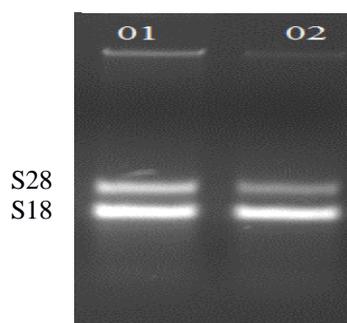


FIGURA 1 - Imagem do gel de agarose 1%, visualizado sob luz ultravioleta, mostrando as duas bandas de rRNA. Onde: o material O1 - clone resistente inoculado com isolado de *C. fimbriata*; o material O2 - clone suscetível inoculado com isolado de *C. fimbriata*.

O processo de hibridação subtrativa supressiva permitiu a obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos que compõe a biblioteca de interesse. Indicando que há uma expressão diferenciada de genes no clone

resistente à murcha de *Ceratocystis*, quando comparado ao clone suscetível, no momento da infecção das mudas com isolado do fungo.

Uma vez que, ambos os clones pertencem à mesma espécie espera-se que suas constituições genéticas sejam o mais semelhante possível, pois seu grau de parentesco é maior do que se pertencessem apenas ao mesmo gênero. Logo, infere-se que, as diferenças em expressão gênica observadas entre eles seja uma resposta adaptativa. Essa expressão gênica pode ser uma resposta à doença, que o clone suscetível, possivelmente, não possui, ou não é capaz de expressar em níveis identificáveis por investigação molecular.

Em um próximo passo, esses genes poderão ser sequenciados e caracterizados, a fim de se conhecer quais deles estão envolvidos no processo de resistência ao patógeno no genótipo resistente.

4. Conclusão

Genes diferencialmente expressos foram obtidos e espera-se que esse material genético encontrado seja responsável pelo caráter de resistência à murcha de *Ceratocystis*. Com o sequenciamento a sua funcionalidade poderá ser elucidada.

5. Referências

- LAIA, M. L.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T.C. Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa-MG, v.25, p.384, 2000
- MAFIA, R. G. et al. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.4, p.817-824, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000500007>>.
- NADEL, R. L. et al. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. **Biological Invasions**, v. 12, n.5, p. 1067-1077, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10530-009-9524-2>>.
- OLIVEIRA, L. S. S. **Agressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* spp.** 2010. 26f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2872/181364_c.pdf?sequence=2>. Acesso em: 10 jul. 2014.
- ZAUZA, E. A. V. et al. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, v.88, p.758-760, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.758>>.