

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INTERAÇÃO CAFEIEIRO/BICHO-MINEIRO¹

Martinati, JC²; Cardoso, DC³; Guerreiro-Filho, O⁴; Vidal, RO⁵; Carazzolle, MF⁶; Maluf, MP⁷

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de pesquisas e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

² Pesquisadora, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas SP, julianamartinati@gmail.com

³ Bolsista, M.Sc., Instituto Agronômico de Campinas, Campinas SP, danielleccard@yahoo.com.br

⁴ Pesquisador Instituto Agronômico de Campinas, Campinas SP, guerreiro@iac.sp.gov.br

⁵ Pesquisador do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) - UNICAMP, Campinas SP, ramon.vidal@gmail.com>

⁶ Pesquisador do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) -UNICAMP, CENAPAD-UNICAMP, LNBio-ABTLuS, Campinas SP, mcarazzo@lge.ibi.unicamp.br

⁷ Pesquisadora da Embrapa Café, Brasília DF, maluf@iac.sp.gov.br

RESUMO: As plantas possuem sofisticados mecanismos de percepção à ataques externos e cujas informações são transmitidas de modo com que todo o seu sistema esteja preparado para agir em defesa própria. Para compreender as bases moleculares deste e outros mecanismos biológicos, pesquisas em larga escala envolvendo a expressão de genes são amplamente aplicadas. Para este estudo foram selecionados dois genótipos de cafeeiros, resistentes e suscetíveis ao bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*), a fim de verificar as possíveis diferenças e semelhanças na expressão dos genes ao longo do processo de infestação. Para tanto, amostras de folhas das plantas foram coletadas em 3 tempos de infestação diferentes sendo eles, tempo zero (T0 – antes da infestação), tempo 1 (T1 – ovoposição) e tempo 2 (T2 – eclosão dos ovos) e os RNA's foram extraídos. A análise de microarranjo foi feita utilizando o modelo 12 X 135K e contou com um total de 22.500 sequencias de EST derivadas no banco de dados do genoma do café (CAFEST) onde cada seqüência foi representada por 6 oligos diferentes. As hibridizações, scanning e normalização dos dados foram realizados utilizando os programas Nimble Scan® e ArrayStar®. As expressões diferenciais foram estabelecidas por comparação dos valores de fold change obtidos, e aquelas cujos valores ficaram +/- 2 foram consideradas não diferenciais. As análises de microarranjos indicaram que em todos os tempos testados houve uma pequena parcela do total de genes que apresentou expressão significativa. Nas plantas não infectadas houve expressão diferencial de 2137 genes (4,09% superexpresso e 5,94% reprimidos em plantas suscetíveis). No tempo 1, os valores de fold change foram significativos para 2359 genes onde 5,29% foram super-expressos e 5,78 foram reprimidos em plantas suscetíveis. Em T2, 4,17% e 6,42% do total de genes foram superexpressos e reprimidos respectivamente em plantas suscetíveis. Com os perfis obtidos foi possível selecionar genes que potencialmente podem distinguir uma interação compatível de uma incompatível e assim, estabelecer alguns dos genes responsáveis pelos mecanismos de defesa em cafeeiros contra o bicho-mineiro. Os genes selecionados servirão como base para buscas de polimorfismos gênicos que possam ser utilizados como marcadores para seleção assistida de progênies resistentes ao inseto.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Leucoptera coffeella*, microarranjos, expressão gênica.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COFFEE/LEAF MINER INTERACTION

ABSTRACT: Plants have evolved sophisticated mechanisms to perceive environmental and biological attacks, and to translate that perception into an adaptive response. To understand the transcriptional basis of this resistance - susceptibility relationship two coffee genotypes, susceptible and resistant to leaf miner (*Leucoptera coffeella*), were compared and changes in defense strategies before and after the pathogen attack were identified through microarray analysis. For this purpose, leaf samples were collected in three different times of infestation: Time zero (T0 – before de infestation), time 1 (T1 – oviposition), time 2 (T2 – eclosion) and the RNA was extracted. A total of 22.500 EST sequences from the Coffee Genome Database were selected for the 12 X 135K array synthesis, each one represented by 6 different oligos. Fluorescence probes were synthesized using mRNA from infected and non-infected plants maintained in greenhouse. Array hybridization, scanning and data normalization were performed using Nimble Scan® e Array Star® platforms. Differential expression was established by comparisons of gene fold change values, and those with values +/-2 were considered differentially expressed. The microarray analysis indicated that the three plant-insect interactions showed a different pattern of response, regarding gene expression profile. In non-infected plants substantial changes were demonstrated in susceptible plants for 2137 genes (4, 09% up-regulated and 5, 94% down-regulated). In T1 the fold change values were significative for 2359 genes where 5, 29% were up-regulated and 5, 78 were down-regulated in susceptible plants. In T2 4, 17% and 6, 42% of the total genes were up and down-regulated respectively in susceptible plants. Among the genes differentially expressed in all interactions tested was possible to differentiate the

compatible and incompatible interaction and so establish some of the genes responsible for defense mechanism in coffee plants against leaf miner. On the other hand these selected genes could be used as markers for breeding program. These preliminary results show strong evidence that the immune responses are finely balanced with other cellular functions. Also the analyses suggest a major metabolic reconfiguration that underscores the complexity of response to pathogen attack.

Key words: *Coffea arabica*, *Leucoptera coffeella*, microarray, plant defense.

INTRODUÇÃO

Sendo o café um dos principais produtos agrícolas cultivados e exportados pelo Brasil, torna-se prioritária a adoção de métodos que visem o aumento na competitividade do setor e da qualidade do produto. Uma ameaça constante aos cafezais, o bicho-mineiro é uma praga que chega a causar grandes prejuízos na produção total dos grãos. A seleção de cultivares resistentes ao bicho-mineiro vem sendo realizada, porém ainda não há disponível uma cultivar com resistência plena em parte devido à escassez de informações sobre os genes e mecanismos de defesa ao inseto. Esta pesquisa tem a finalidade de dar continuidade aos programas de melhoramento agregando maiores informações para o programa de seleção de novas cultivares resistentes ao bicho-mineiro, já iniciado no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), mediante aporte de técnicas que superem as limitações atuais. Deste modo propõe-se caracterizar a expressão em larga escala de genes envolvidos nos mecanismos de defesa de cafeeiros ao bicho-mineiro através de microarranjos de cDNA. Os objetivos deste trabalho foram identificar genes expressos durante a infestação do bicho-mineiro em plantas de cafeeiros suscetíveis e resistentes utilizando microarranjos de cDNA comparando os padrões de expressão nos diferentes grupos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras - Foram utilizadas 30 plantas selecionadas em uma progênie segregante, sendo 15 resistentes (R) e 15 suscetíveis (S) ao inseto. Folhas das plantas de cada um destes grupos foram expostas à infestação de *Leucoptera coffeella* em gaiolas de criação. As folhas infestadas foram coletadas em diferentes tempos sendo eles: Tempo Zero – plantas sem infestação; tempo 1 (T1) – ovoposição; tempo 2 (T2) eclosão dos ovos. Folhas colhidas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C até o momento do uso.

Extração de RNA total e controle da extração - O RNA total das folhas foi extraído de acordo com Chang *et al.* (1993). A dosagem do RNA total foi feita em espectrofotômetro UV modelo UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu), diluído em 100x, medindo-se a absorbância a 260nm e 280nm. Os cálculos feitos de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Verificou-se a integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio. Antes de enviar as amostras de RNA foi realizada a síntese de cDNA para análise de funcionalidade. O kit RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) foi usado para a síntese de cDNA de acordo com as recomendações do fabricante. Para todas as amostras foi utilizado 500ng de RNA total. A dosagem do cDNA foi feita em espectrofotômetro UV modelo UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu), diluído em 500x. Os cálculos feitos de acordo com Sambrook *et al.* (1989) e em seguida foi realizada a amplificação do gene β -Actina para validação dos cDNAs.

Análise da expressão em microarranjos de DNA – As amostras de RNA extraídos foram novamente quantificados e analisados em Bioanalyzer 1000 (Agilent). As amostras foram divididas em pools para minimizar as variações individuais das amostras de RNA. Três replicadas foram utilizadas para o preparo do pool de cada amostra utilizada para as hibridizações. As amostras foram enviadas à Helixxa onde o cDNA foi sintetizado e marcado com Cy3. Quantidades iguais de RNA total de cada amostra foram convertidas em cDNA de dupla fita utilizando o kit SuperScript II cDNA Conversion Kit (Invitrogen). Todos os equipamentos e kit's que foram utilizados nesta etapa do experimento foram fornecidos pela Roche/NimbleGen e executados pela Helixxa.

Design da lâmina de microarranjo – Para a seleção das sequências para o chip de oligonucleotídeos 48-mer sintetizado pela NimbleGen-Roche foram inicialmente utilizadas todas as sequências dos contigs, reads e singlets contidos nas bibliotecas de EST's do Projeto Genoma Café. Dos 33 mil EST's obtidas no Projeto Genoma Café, 21.296 foram selecionadas para compor a lâmina de microarranjo. Para a obtenção desse número de seqüências, foi realizado um *screening* dos reads e contigs presentes no CAFEST, excluindo singlets provenientes de bibliotecas não relacionadas à nossa área de estudo. Sequências com menos de 100 bases foram descartadas. As demais foram submetidas à filtragem usando-se com BLASTN contra alguns contaminantes (proteínas não relacionadas às plantas). As sondas foram construídas seguindo os seguintes parâmetros: Não conter homopolímeros de mais de 7 bases, não conter mais de 60% de nenhuma das 4 bases, o conteúdo de CG estar entre 35 e 55% e *Tm* entre 68 e 76°C. A combinação destes fatores garante que cada sonda detecte apenas um mRNA correspondente. O arranjo final contém 127.176 sondas representando os 21196 genes de cafeeiro (6 sondas/oligonucleotídeos por gene) mais os genes controle totalizando assim 135.000 sondas em um arranjo de 12 repetições (Figura 1). Os oligonucleotídeos foram construídos

para a extremidade 3' dos genes no intuito de detectar as fitas sintetizadas pela transcriptase reversa. A confecção da lâmina e as hibridizações foram realizadas pela empresa NimbleGen-Roche seguindo o protocolo da empresa.



12x135k

Figura 1 - Modelo da plataforma de microarranjo contendo 12 repetições de 135.000 seqüências representativas.

Hibridização e lavagem das lâminas, scanning e análise dos dados - Os processos de hibridização, lavagem, scanning, coleta de dados e normalização inicial de dados foram feitos na Helixxa de acordo com os protocolos estabelecidos pela empresa NimbleGen-Roche. Os dados de expressão gênica foram analisados através do scanner GenePix 4000B (Molecular Devices) associado a um software de normalização de dados (NimbleScan v2. 5) que utiliza o algoritmo RMA (Robust Multi Array Analysis) que consiste nas seguintes etapas: eliminação da fluorescência de background, normalização e transformação dos dados. Para as análises comparativas, foi utilizado o programa de comparação de expressão gênica ArrayStar (DNAStar). Todos esses procedimentos estão listados no *NimbleGen Arrays User's Guide Gene Expression Analysis* disponível em www.nimblegen.com/products/lit/expression_userguide.

Análises estatísticas – Os dados foram analisados utilizando o procedimento de Análise Significativa de Microarranjos (SAM) (Tuscher et al., 2001), através do software R. Os dados transformados foram organizados conforme disposição requerida pelo programa o qual foi utilizado para a identificação dos EST diferencialmente expressos, seguindo as orientações contidas no manual do programa. O SAM baseia suas análises estatísticas em uma série de testes-*t* específicos para cada gene, adaptadas para a detecção de genes diferencialmente expressos em larga escala. Os genes que apresentaram níveis de expressão além de apropriado limiar são designados como genes com resposta diferencial potencialmente significativa. Além disso, o SAM calcula o valor de "Fold Change", que é a razão entre o valor obtido para o experimento tratado pelo valor obtido para o experimento controle para um dado gene, para cada EST e o valor de descobertas falsas (FDR - *False Discovery Rate*) para um conjunto de genes, neste caso ESTs. A relação dos genes diferencialmente expressos foi obtida ajustando o valor delta do SAM de modo a obter um valor "Fold Change" maior ou igual a 2 ou menor ou igual a -2. A anotação dos genes foi realizada no banco de dados do Genoma Café.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Qualidade do RNA - Todas as amostras utilizadas para as análises de microarranjo foram testadas previamente. Os géis de agarose mostraram que não houve degradação do RNA no momento da extração. Os índices de qualidade como valores absolutos de quantificação (ng/μL), relação A_{260}/A_{280} se mostraram satisfatórios. As amplificações do gene que codifica uma β-actina também apresentaram resultado positivo. Além do mais as análises realizadas em Bioanalyzer (Agilent) apresentaram índice de qualidade (RIN) maiores que 8,0 sendo consideradas apropriadas para as análises de microarranjos.

Design da lâmina de microarranjo - A tabela 1 lista as biblioteca selecionadas para a construção da lâmina de microarranjos .

Tabela 1 - Dados das bibliotecas de EST's utilizadas para a construção da plataforma dos microarranjos

Biblioteca	Especie	Condição fisiológica	Números de reads válidas
AR1, LP1	<i>C. arabica</i>	Plântulas e folhas tratadas com ácido aracdônico	5664
CB1	<i>C. arabica</i>	Suspensão de células tratadas com acibenzolar-S-methyl e brassinoesteróides	10311
CL2	<i>C. arabica</i>	Hipocotilédones tratados com acibenzolar-S-methyl	11615
EB1	<i>C. arabica</i>	Embrião zigótico	192
EC1	<i>C. canephora</i>	Calos embriogênicos de <i>Coffea canephora</i>	8050
CA1, IC1, PC1	<i>C. arabica</i>	Calos não embriogênicos com e sem 2,4D	13135
LV4, LV5	<i>C. arabica</i>	Folhas jovens de ramos ortotropicos	15067

LV8, LV9	<i>C. arabica</i>	Folhas maduras de ramos plagiotrópicos	11864
NS1	<i>C. arabica</i>	Raízes infestados com nematóides	569
PA1	<i>C. arabica</i>	Calos embriogênicos primários	2483
RM1	<i>C. arabica</i>	Folhas infectadas com bicho-mineiro e ferrugem	5567
RT3	<i>C. arabica</i>	Raízes	560
RT5	<i>C. arabica</i>	Raízes tratadas com acibenzolar-S-methyl	2311
RT8	<i>C. arabica</i>	Suspensão de células estressadas com alumínio	9119
RX1	<i>C. arabica</i>	Caulos infectados com <i>Xylella</i> spp.	9563
SH1	<i>C. canephora</i>	Folhas de plantas tolerantes (seca) – estresse hídrico (<i>Coffea canephora</i>)	7368
SH2	<i>C. arabica</i>	Plantas de campo com estresse hidrico (pool de tecidos)	6824
SS1	<i>C. arabica</i>	Plantas de campo em condições normais (pool de tecidos)	960

Microarranjos - A técnica de microarranjos de cDNA foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica de dois genótipos de cafeeiro, um suscetível e um resistente ao bicho-mineiro, nas diferentes etapas do desenvolvimento dos sintomas da infestação.

Após análises estatísticas comparativas foram identificadas 2139, 2359 e 2257 ESTs diferencialmente expressas nas interações T0S_T0R, T1S_T1R e T2S_T2R respectivamente. A figura 2 ilustra o número de genes diferencialmente expressos (super expressos e reprimidos) nas interações estudadas, considerando que os genes diferencialmente expressos são aqueles cujos valores de \log_2 (*fold-change*) encontrados foram maiores e menores que 2. Os níveis de expressão mais significativos foram evidenciados na interação T0S_T0R, com valores de fold change variando entre 400 e 1000 vezes menos expressos e entre 200 e 400 vezes mais expressos em plantas suscetíveis. As outras duas interações apresentaram níveis de expressão variando entre 150 e 350 vezes mais expressos e 10 a 15 vezes menos expressos.

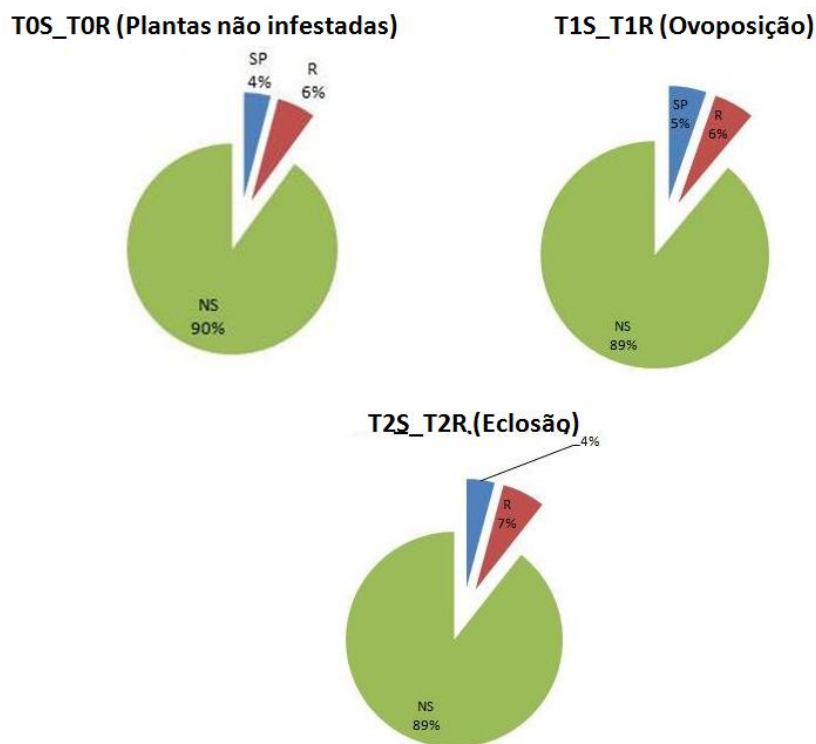


Figura 2 - Ilustração representativa dos genes diferencialmente expressos (SP – super-expressos; R – reprimidos; NS – não significativos) em cada uma das interações estudadas. * Eclosão e ovoposição referem-se ao evento que marca a divisão de fases do desenvolvimento do processo de infestação do inseto, designados respectivamente de tempo 1 (T1) e tempo 2 (T2).

A figura 3 foi obtida através das análises com o programa ArrayStar e ilustra de um modo diferentes os resultados de expressão gênica obtidos.

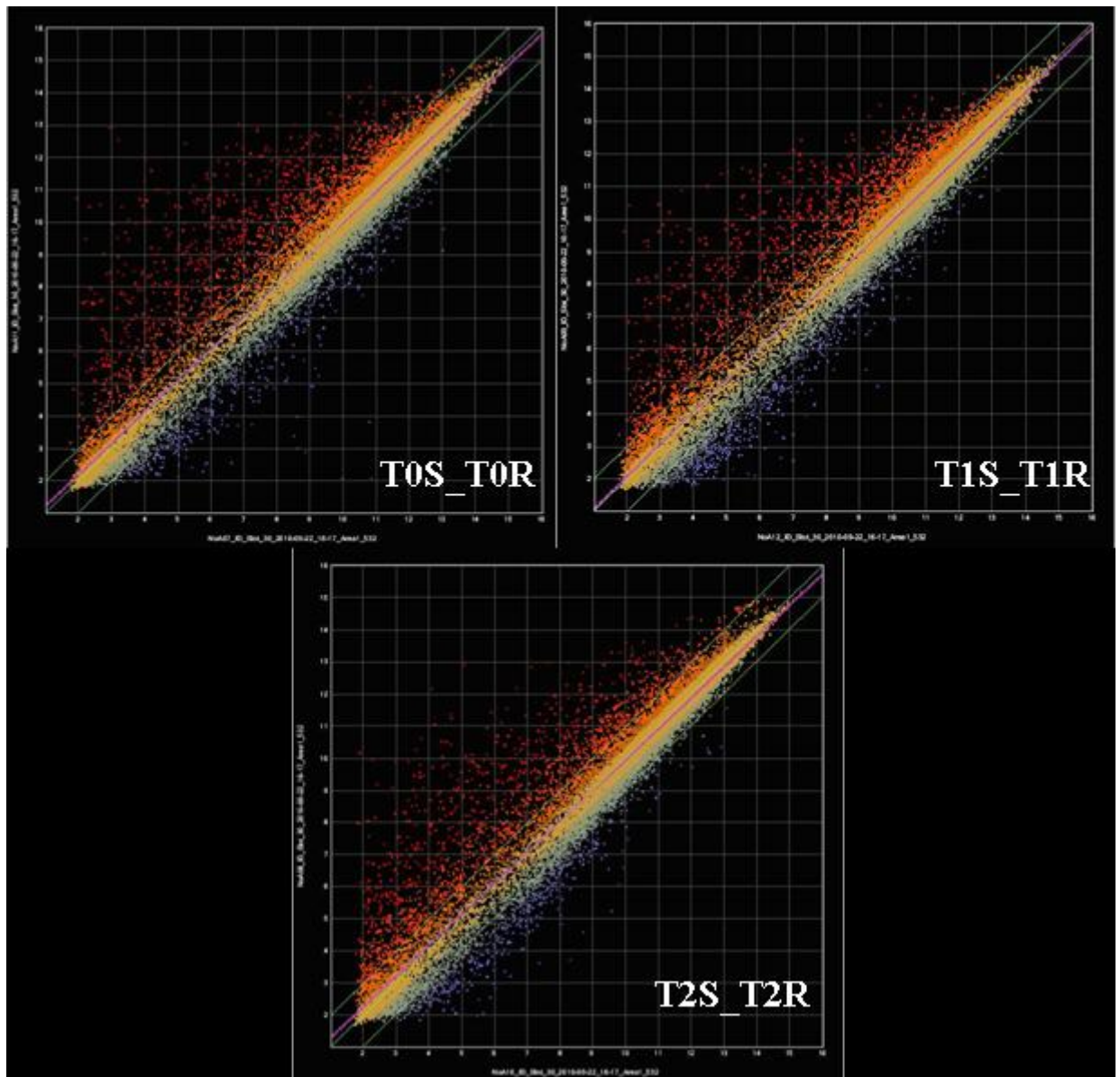


Figura 3 - Imagens obtidas através do programa ArrayStar calculadas a partir dos valores de fold change de cada interação estudada. Os pontos em vermelho e azul ilustram os genes diferencialmente expressos sendo representados por super-expressos e reprimidos respectivamente. A barra diagonal, com os pontos alaranjados, representa os genes cujos valores de fold change não foram representativos (valores entre 2 e -2).

CONCLUSÕES

Pelos perfis de expressão dos 21.196 genes obtidos em cada uma das interações estudadas foi possível concluir que:

- Plantas suscetíveis e resistentes exibem perfis de expressão gênica distintos mesmo antes da exposição ao inseto;
- Para cada fase do processo de desenvolvimento dos sintomas causados pelo bicho mineiro há um padrão de expressão gênica peculiar;
- Os genes responsáveis pela característica de resistência ao inseto são estrategicamente balanceados e coordenados com outras funções celulares;
- A ação de outros genes menos evidentes nos processos de defesa, como os de manutenção celular, deve ser considerada para a conquista da resistência em cafeeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG, S., PURYEAR, J. E CAIRNEY, J.. A single and efficient method for isolating RNA from pinetrees. *Plant Molecular Biology* v.11, p. 113-116, 1993.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. E MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^o ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York, 1989.

TUSHER, V; TIBSHIRANI, R.; CHU, C. Significance analysis of microarrays applied to ionizing radiation response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.98, n. 9, p.5116-5121, 2001.