

IDENTIFICAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS EXPRESSAS ETIQUETADAS (ESTs) ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO DE ARROZ E DO FUNGO CAUSADOR DA BRUSONE (*Magnaporthe grisea*)

Bevitori, R.¹; Reis, M.S.²; Diógenes, R.²; Brondani, R.V.¹; da Silva, F.R.³; de Paula, A.W.M⁴; Grossi-de-Sá, M.F.^{3, 4}.

¹EMBRAPA Arroz e Feijão; ²UCG – Universidade Católica de Goiás; ³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, ⁴UCB – Universidade Católica de Brasília.
bevitori@cnpaf.embrapa.br

RESUMO

A ocorrência de perdas na produtividade e na qualidade da cultura de arroz em decorrência de doenças fúngicas é uma realidade na agricultura nacional, causando substanciais prejuízos à economia e à sociedade. A brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea*, é a doença do arroz mais expressiva no Brasil, provocando perdas significativas na produtividade das cultivares susceptíveis, sendo de difícil controle químico, cultural e mesmo genético. Nesse contexto, cobre-se de particular relevância a utilização de aplicações inovadoras, com potencial de inovação tecnológica, relacionadas a mecanismos de respostas, sejam elas moleculares, fisiológicas, bioquímicas ou genéticas da planta a este fungo. Considerando que um dos requisitos primordiais para o uso das novas ferramentas biotecnológicas é a identificação de genes, duas bibliotecas subtrativas foram construídas utilizando-se mRNA isolado de folhas de arroz infectadas por *M. grisea*, com o objetivo de construir um banco de ESTs visando analisar a expressão de genes induzidos ou suprimidos durante a interação patógeno-hospedeiro. Até o presente momento, 1232 ESTs foram geradas e a análise das mesmas, utilizando métodos computacionais, encontra-se em andamento. Adicionalmente, a fornecer informações do modelo de expressão de genes de defesa do arroz, este estudo disponibilizará genes para estudos de genômica funcional e desta maneira poderá elucidar o mecanismo de resistência da planta a este fungo.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o nono produtor mundial de arroz (*Oryza sativa* L.), uma das principais fontes de alimento da população brasileira, o que lhe confere grande importância sócio-econômica. Entretanto, um dos graves obstáculos para a manutenção e estabilidade da produção nacional de arroz, cultivado em todas as regiões do país, é a susceptibilidade das cultivares ao fungo *Magnaporthe grisea*, causador da brusone, considerada a mais importante enfermidade do arroz devido ao seu alto potencial destrutivo (OU, 1985). A brusone ocorre em todo o território brasileiro, do Rio Grande do Sul ao Amazonas. Os prejuízos são variáveis, sendo maiores em arrozais de terras altas, no Centro-Oeste brasileiro, onde, em situações mais drásticas, as perdas podem chegar até a 100%. No Rio Grande do Sul, maior produtor nacional de arroz, a doença causa grandes danos, atingindo, em alguns anos, 10% da área semeada, provocando reduções desde 10-15% até 70-80% da média da produção de lavoura (IRGA, 1997). No Estado do Tocantins, que cultiva anualmente cerca de 70 mil hectares de arroz, embora não existam estimativas, os prejuízos são significativos, com severa ocorrência da brusone nas folhas devido à falta de água na fase vegetativa. Apenas na Região Nordeste e nos Estados do Pará e Amazonas, a incidência da brusone é baixa e menos importante do que outras doenças que afetam o arroz.

O controle da brusone vem sendo feito pela aplicação de fungicidas e do manejo da cultura, além do uso de cultivares resistentes. No entanto, problemas associados a práticas culturais específicas ocorrem, e a resistência do *M. grisea* ao fungicida é uma preocupação constante dos cientistas, ao mesmo tempo em que há uma considerável necessidade de desenvolvimento de novos fungicidas compatíveis com o ambiente e com a durabilidade no manejo da doença. A obtenção de cultivares resistentes à brusone pelo método clássico de melhoramento é dificultada em função da alta variabilidade e da existência de numerosas raças do fungo. Dois a três anos após o lançamento, novas cultivares se tornam susceptíveis, em decorrência do aparecimento de novas raças. Embora o mapeamento de mais de 25 genes de resistência e muitos QTL tenham sido relatados na literatura, o mecanismo genético da resistência à brusone, bem como a base molecular da resposta do arroz a este fungo, é ainda pouco entendida (WANG *et al.* 1999; BRYAN *et al.* 2000; ZHUANG *et al.*, 2002).

Neste contexto, o presente estudo deverá gerar inúmeras possibilidades para estudos da relação estrutura/função gênica via análise genômica funcional, de prospecção de genes e mapeamento comparativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Duas linhas semi-isogênicas para resistência à brusone, desenvolvidas na Embrapa Arroz e Feijão, foram utilizadas neste estudo. A linha resistente C101 LAC e a susceptível C101 PKT foram desafiadas com isolados do fungo *M. grisea* (ID 14 isolado de Metica 1). Duzentas folhas de cada tratamento, com sintomas típicos de brusone, foram coletadas nos períodos de 4, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80° C até o momento do uso. O mesmo procedimento foi efetuado para o controle (sem infecção).

Construção da biblioteca subtrativa

O RNA total foi isolado utilizando Trizol (Invitrogen) e tratado com Turbo DNA-free (Ambion). Quantidades iguais de RNA de cada tratamento foram misturadas, e o mRNA foi extraído com o kit Oligotex (Qiagen). Para a construção da biblioteca subtrativa, utilizou-se kit PCR Select cDNA Subtraction (Clontech), segundo recomendações do fabricante, com leves modificações. Duas bibliotecas, uma direta e outra reversa, foram construídas. Os produtos da última reação de PCR foram clonados no vetor PCR 2.1 (Invitrogen) e, posteriormente, células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas.

Seqüenciamento e análise dos dados

Clones de cDNA foram seqüenciados na direção 5' usando ABI PRISM 3100 (Applied BioSystems) e o kit de seqüenciamento Big-dye terminator (Applied BioSystems). Os cromatogramas referentes ao seqüenciamento automático dos clones foram analisados utilizando-se o software Phred (EWING *et al.*, 1998). As seqüências geradas foram processadas, com remoção de seqüências provenientes de rRNA e eliminação de porções contendo seqüências de vetor, adaptador, caudas de *poliA* e bases de baixa qualidade. Posteriormente, as seqüências foram agrupadas com uso do programa CAP3 (HUANG e MADAN, 1999) para a formação do conjunto UniGene de Arroz, conforme metodologia estabelecida por Telles e da Silva (2001), com algumas modificações. As seqüências consenso de cada UniGene foram comparados com seqüências protéicas presentes no GenBank, utilizando-se o software BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Apenas semelhanças com *e-values* maiores que 0.00001 (10⁻⁵) foram consideradas.

RESULTADOS

Do total de 1.232 ESTs geradas, 852 foram agrupadas em 683 *contigs*. Destes, 595 são formados por apenas uma leitura. O *contig* mais denso é formado por 27 leituras. Do total, 214 (35%) não apresentam similaridade com proteínas já descritas. A anotação funcional se encontra em andamento.

PERSPECTIVAS

Espera-se obter uma coleção de ESTs adequada para utilização em posteriores estudos de identificação de genes envolvidos na interação planta-*M. grisea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL S.F.; MADDEN T.L.; SCHAFFER A.A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25 p.:3389-402. 1997.
- BRYAN, G.T.; WU, K-S.; FARRAL, L.; JIA, Y.; HERSHEY, H.P.; McADAMS, S.A.; FAULK, K.N.; Donaldson, G.K.; TARCHINI, R.; VALENT, B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell**, v. 12, p. 2033-2045. 2000.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P.. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185. 1998.
- FISHER, R.A. "On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P". **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 85, p. 87-94. 1922
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. p. 868-877. 1999.
- IRGA. Arroz: custo de produção médio ponderado em sistema convencional RS, safra 96/97. **Cachoeirinha**, v.12, p.1-47, 1997.
- OU, S.H. Rice disease. 2 ed. Kew: **CMI**, 1985. 380p
- TELLES, G.P.; DA SILVA, F.R. Trimming and clustering sugarcane ESTs. **General. Molecular Biology**, v. 24, p. 17-23. 2001.
- ZHUANG, J.Y.; MA, W.B. ; WU, J.L.; CHAI, R.Y.; LU, L.; FAN, Y.Y.; JIN, Z.M.; LEUNG, H.; ZHENG, K.L. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. **Euphytica**, v. 128, p. 363-370. 2002.

WANG, Z.X. ; YANO, M. ; YAMANOUCHI, U ; IWAMOTO, M.; MONNA, L.; HAYASAKA, H.; KATAYOSE, Y.; SASAKI, T. The *Pib* gene for the rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Plant Journal**, v. 19, p.55-64. 1999.