

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E CLONAGEM PARA ENSAIOS DE ATIVIDADE E INTERAÇÃO DE PR-1 EXPRESSOS PELO CACAUEIRO EM DEFESA AO AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA VASSOURA DE BRUXA

Marcus Vinícius Fernandes **Prior**¹; Renata Moro **Baroni**²; Natalia Gomes **Vieira**³;

Elaine Soligo **Arruda**⁴; Jorge Maurício Costa **Mondego**⁵

Nº 14130

RESUMO - *A vassoura de bruxa é uma das principais doenças fúngicas do cacau e é causada pelo basidiomiceto Moniliophthora perniciosa. Esta doença é a principal causa do decréscimo na produção do cacau, já que métodos de controle baseados na aplicação de fungicidas são ineficientes, possivelmente devido à existência de mecanismos de resistência do patógeno. O sequenciamento do genoma do cacau permitiu a identificação de proteínas previamente caracterizadas como participantes dos mecanismos de defesa da planta em resposta ao patógeno. Dentre as proteínas consideradas importantes destacamos as proteínas com domínio conservado SCP/TAPS, conhecidas também como proteínas relacionadas à patogênese PR-1. Em cacau existem 13 genes sintetizadores dessas proteínas, denominados TcPR-1 (Theobroma cacao PR-1). Este trabalho visa à análise da expressão em diferentes órgãos do cacau e à clonagem em vetor de expressão em sistema heterólogo dos genes TcPR-1c, TcPR-1d e TcPR-1l. Tais genes foram caracterizados como muito expressos na interação cacau-M. perniciosa, indicando sua importância nesse patossistema. O entendimento da função e expressão gênica desses genes será importante para os estudos relacionados ao desenvolvimento de variedades de cacau não suscetíveis à vassoura de bruxa.*

PALAVRAS-CHAVE: Cacau, PR-1, Defesa vegetal, Expressão gênica.

1. Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP; marcusvprior@gmail.com

2. Colaboradora, Bolsista FAPESP, Doutoranda em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP- SP

3. Colaboradora, Bolsista FAPESP, Doutoranda em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP- SP

4. Colaboradora, mestranda em Agricultura Tropical e Subtropical, IAC-SP

5. Orientador: Pesquisador do Instituto Agrônomo, Campinas-SP; jmcmondego@gmail.com



ABSTRACT - The witches' broom disease (WBD) is one of the main fungal diseases of cacao and is caused by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. This disease is the main cause of the decline in cacao production, because control methods based on the application of fungicides are ineffective, possibly due to the existence of mechanisms of pathogen resistance. Sequencing of cacao genome allowed the identification of proteins previously characterized as participants of the mechanisms of plant defense in response to the pathogen. Among the proteins considered important are proteins with conserved domain SCP / TAPS, also known as pathogenesis-related proteins PR-1. There are 13 genes encoding PR-1 proteins in cacao, named as TcPR-1 (*Theobroma cacao* PR-1). The objectives of this work are the TcPR-1 gene expression analyses in different organs of cacao and also the cloning into a heterologous system expression vectors of TcPR-1c, TcPR-1d and TcPR-1l. Such genes were characterized as up-regulated in cacao-*M. perniciosa* interaction, indicating their importance in this pathosystem. The understanding of the function and expression of these genes will be important for studies related to the development of cacao varieties not susceptible to WBD.

KEY-WORDS: Cacao, PR-1, Plant defense, Gene expression.

1 INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao*) é uma planta arbórea tropical pertencente à família Malvaceae, originária da região amazônica (Motamayor *et al.*, 2002). Sua importância está na utilização dos frutos para a produção de cosméticos, licor, geléias, sorvetes, sucos e principalmente na utilização das sementes como matéria prima para a produção de chocolate (Purdy e Schmidt, 1996). Estima-se que a indústria do chocolate movimenta anualmente cerca de 60 bilhões de dólares no mercado mundial, o que faz do cacaueiro uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo. O Brasil ocupa a sexta posição no *ranking* de produção com 158 mil toneladas de cacau por ano. No entanto, até 1994 o Brasil ocupava a segunda posição, chegando a produzir 400 mil toneladas por ano (ICCO 2010). O principal fator dessa queda produtiva foi o aparecimento no sul da Bahia, principal região produtora nacional, da doença conhecida como vassoura de bruxa. Essa doença é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*.

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* pertence à família *Tricholomataceae* (Purdy e Schmidt, 1996). O ciclo de vida do fungo é hemibiotrófico e a infecção acontece através do depósito de basidiósporos em tecido meristemático úmido (Frias *et al.*, 1991), que ao germinarem iniciam o estágio biotrófico caracterizado pela formação de micélios espessos



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

monocarióticos e sem grampos de conexão. Como sintoma dessa etapa da doença ocorre perda de dominância apical e formação de ramos deformados conhecidos como “vassouras verdes”. Entre quatro e oito semanas, as vassouras verdes sofrem necrose e morrem sendo, então, denominadas “vassouras secas”. A morte do tecido infectado marca a transição do fungo para a fase saprotrófica (Evans 1980; Meinhardt *et al.*, 2008). Nesta etapa o fungo sofre dicarionização de seu micélio, apresentando grampos de conexão (Kilaru e Hasenstein, 2005). Após esta fase, ocorre um período de latência até que os basidiósporos levados por água ou vento poderão infectar outras plantas, reiniciando o ciclo (Wheeler, 1985). Muitos métodos de controle da doença vêm sendo utilizados, porém sem muito sucesso. Dentre as tentativas realizadas destacam-se a poda fitossanitária, o uso de fungicidas, o controle biológico e o desenvolvimento de variedades de cacau resistentes, cuja resistência vem sendo quebrada pela adaptabilidade do fungo (Purdy e Schmidt, 1996).

Um dos genes mais estudados relacionados com os mecanismos de defesa vegetal codifica a proteína conhecida como PR-1 (*Pathogenesis Related Protein -1*; Van Loon *et al.*, 2006). Essas proteínas compõem um grupo de 17 famílias (PR-1 a PR-17) que foram descobertas em *Nicotiana tabacum* infectado pelo Vírus do Mosaico (TMV). Muitas destas proteínas são induzidas por sinalização de compostos relacionados à defesa vegetal como ácido salicílico, ácido jasmônico ou etileno e apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* (Van Loon *et al.*, 2006).

Embora proteínas PR-1 sejam amplamente reconhecidas como componentes do sistema de defesa de plantas, suas funções não são bem definidas (Van Loon *et al.*, 2006). Todas estas proteínas possuem um domínio comum conservado formado por quatro alfa-hélices e quatro folhas-beta (Van Loon *et al.*, 2006). Essa é uma das características que levou à formação da superfamília SCP/TAPS (*Sperm-coating protein - Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7*). Em sua grande maioria essas proteínas possuem um peptídeo sinal para a secreção para o meio extracelular e contêm quatro a seis cisteínas. A formação das pontes dissulfeto geradas por essas cisteínas torna essas proteínas mais compactas e resistentes, fator importante para proteínas secretadas e que devem superar a ação de proteases do meio extracelular (Van Loon and Van Strien, 1999).

A fim de catalogarmos proteínas PR-1 do cacau, a sequência da proteína PR-1 conhecida como P14 (GenBank P04284) foi usado como isca numa busca tBLASTn (Altschul *et al.*, 1990) nos bancos de sequências genômicas do cacau (<http://www.cacaogenomedb.org> e <http://cocoagendb.cirad.fr>). Treze membros com sequência significativamente similar a P14 foram identificados através de buscas nesses bancos de dados (Teixeira *et al.*, 2013). A partir da análise de dados de RNAseq, foi identificado que dois desses genes *TcPR-1* codificam proteínas com



características de receptores do tipo quinase membranares (TcPR-1f e TcPR-1g; Teixeira *et al.*, 2013), sendo que o último tem a expressão induzida após a infecção por *M. perniciosa* (tabela 1). Dentre os outros onze genes *TcPR-1*, que codificam proteínas PR-1 provavelmente secretadas para o apoplasto, três destes (*TcPR-1c*, *TcPR-1d*, *TcPR-1l*) são mais expressos em vassouras verdes do que em plantas não infectadas (Teixeira *et al.*, dados não publicados).

Tabela 1. Genes *TcPR-1* cuja expressão é induzida durante a interação cacau-*M. perniciosa*.

PR-1 em cacau	Identificação no genoma cacau (http://www.cacaogenomedb.org)	'Fold-Change'*
<i>TcPR-1c</i>	CGD0027635	65
<i>TcPR-1d</i>	CGD0027628	3,8
<i>TcPR-1g</i>	CGD0006833	4,1
<i>TcPR-1l</i>	CGD0000407	21,2

*Fold Change significa quantas vezes o gene foi mais expresso em vassoura verde do que em plantas não infectadas. Dados retirados do transcriptoma da vassoura de bruxa (Teixeira *et al.*, dados não publicados).

Tendo em vista o aumento da expressão desses genes na interação cacau-*M. perniciosa*, espera-se que proteínas PR-1 tenham importância no mecanismo de defesa contra o patógeno em questão. Analisaremos a expressão dos genes *TcPR-1c*, *TcPR-1d* e *TcPR-1l* em diferentes órgãos do cacau através da técnica de PCR quantitativo em tempo-real ('qPCR Real-Time'). Esses resultados nos apontarão em qual órgão os genes são mais expressos. Será executada a clonagem e expressão das proteínas PR-1 escolhidas, em sistema heterólogo de expressão. O sistema escolhido foi *Escherichia coli*. A purificação das proteínas será importante para ensaios posteriores, como caracterização de possível atividade enzimática, antifúngica e de interação com outras proteínas, inclusive entre as proteínas TcPR-1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

A variedade de *Theobroma cacao* a ser utilizada foi 'Cacau comum' que é suscetível à *M. perniciosa*. O material genético será extraído de folhas, caules e raízes de cacau.

2.2 Clonagem dos genes *TcPR-1*

Os genes *TcPR-1* foram amplificados de DNA genômico de folhas de cacau através de técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando os programas Gene Runner (www.generunner.net), excluindo as regiões gênicas que codificam



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

peptídeos sinal, previamente anotadas com o auxílio do programa Signal-P (Emanuelsson *et al.*, 2007). Foram adicionadas, nas extremidades dos oligonucleotídeos, sequências de DNA referentes a sítios de enzimas de restrição propícias para a clonagem em vetor de expressão (ver abaixo). O material amplificado foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega). Após clonagem e replicação do plasmídeo em *E. coli* DH5-alpha, os vetores foram purificados através de isolamento de DNA plasmidial utilizando o kit Wizard SV Gel Extraction (Promega, EUA) e digeridos com as enzimas de restrição. Os fragmentos referentes aos genes TcPR-1 purificados do gel de agarose foram clonados no plasmídeo de expressão pETSUMO (*Small ubiquitin-like modifier*).

2.3 Real-Time PCR

Para verificarmos o padrão de expressão das TcPR-1 em diferentes tecidos do cacauero, a presença de transcritos foi avaliada através de qPCR. A síntese de cDNA a partir de mRNA, previamente tratado com DNaseI (Invitrogen) foi feita segundo o protocolo da enzima transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen, EUA) modificado. Os experimentos de qPCR foram executados no sistema 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied biosystems, EUA) utilizando SYBR® GreenER™ (Promega, EUA). Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Life Technologies, EUA)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Material Vegetal

Para executarmos as análises de expressão gênica, estabelecemos um mini-viveiro contendo plântulas de cacau cv. Cacau comum (Figura 1). Tais plântulas vêm se desenvolvendo muito bem em nossa estufa, apesar das diferenças climáticas entre sul da Bahia com relação à região de Campinas.

3.2 Clonagem dos genes *TcPR-1*

A partir de PCR, os genes *TcPR-1* foram amplificados de DNA genômico de folhas de cacau. Como nosso intuito era de clonar tais genes para expressão de proteínas, foram desenhados oligonucleotídeos contendo sequências de DNA referentes a sítios de enzimas de restrição propícias para a clonagem em vetor de expressão. Sabendo-se que os genes *TcPR-1* possuem somente um éxon (não possuem introns), utilizamos RNA contendo resquícios de DNA genômico o qual foi utilizado como molde para amplificação das sequências codantes (Figura 1).



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

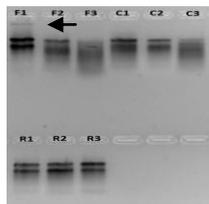


Figura 1. RNA extraído de folha, caule e raiz de cacau. A amostra F1 não foi tratada com DNase em comparação com outras tratadas. Seta indica presença de DNA genômico na amostra F1. Gel de agarose 1% TBE 0,5X.

Os genes *TcPR-1c*, *TcPR-1d* e *TcPR-1l* foram amplificados e seus fragmentos foram purificados de gel de agarose (Figura 2).

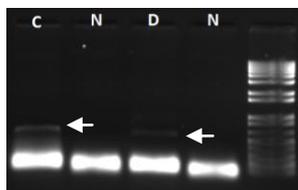


Figura 2. Amplificação dos genes *TcPR-1c* e *TcPR-1d* através do PCR. (N) – reação realizada sem a presença do molde para comprovar que não houve contaminação. Setas indicam amplificações. Gel de agarose 1% TBE 0,5X.

Os amplicons foram purificados do gel de agarose e clonados no plasmídeo pGEM T-Easy. A figura 3 demonstra a confirmação das clonagens.

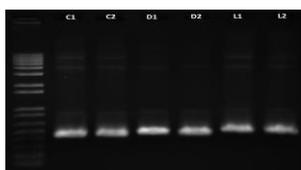


Figura 3. Confirmação das Clonagens. PCR utilizando como molde os plasmídeos pGEM T-Easy, hipoteticamente contendo os genes *TcPR-1*, para confirmar se os fragmentos foram realmente clonado. Gel de agarose 1% TBE 0,5X.

A partir da confirmação das clonagens em pGEM T-Easy, os plasmídeos contendo os genes *TcPR-1c* e *TcPR-1l* foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sa*II e o gene *TcPR-1d* foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sa*CI. Os fragmentos referentes aos genes foram cortados e purificados do gel de agarose. Em seguida, estes foram ligados ao plasmídeo de expressão de proteínas pETSUMO, previamente digerido com as combinações de enzimas citadas acima. Após PCR foi confirmada a clonagem nos genes no plasmídeo pETSUMO (Figura 4).



Figura 4. Confirmação das Clonagens em pETSUMO através de PCR, utilizando como molde os plasmídeos extraídos. Gel de agarose 1% TAE 1X.

Os ensaios de expressão de proteínas estão em andamento. Esperamos que até o relatório final PIBIC tenhamos tais resultados.

3.3 Real-Time PCR

A fim de quantificar o padrão de expressão dos genes *TcPR-1 c, d e l* em diferentes tecidos do cacauero, a presença de transcritos foi avaliada através de RT-qPCR. Para tal, os RNAs de raiz, caule e folha de plântulas de cacau de seis meses de idade RNA foram tratados com a enzima DNaseI, a fim de eliminar a presença de DNA genômico (vide figura 1).

A partir da obtenção dos RNAs sem contaminação de DNA genômico, foi feita a síntese de cDNA e em seguida a execução do RT-qPCR. Após serem feitos testes de eficiência dos oligonucleotídeos e de diluições de cDNA, partimos para os testes finais, utilizando o gene *ACPB1* de cacau como controle de expressão constitutiva.

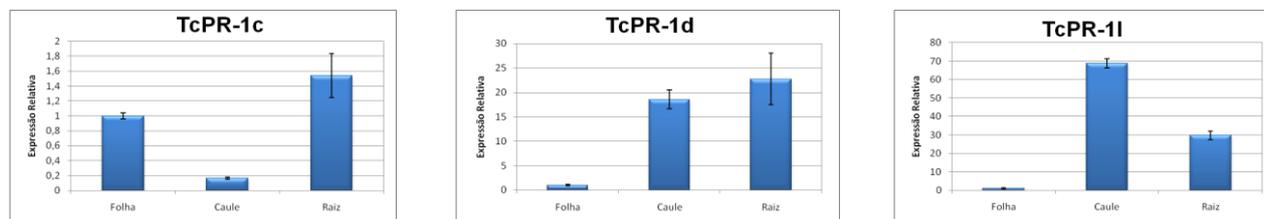


Figura 5. RT-qPCR demonstrando expressão relativa dos genes *TcPR-1c, TcPR-1d e TcPR-1l* em diferentes tecidos de cacau, utilizando o gene *ACPB* como referência.

Pelos dados apresentados podemos verificar que o gene *TcPR-1c* possui baixa expressão nos tecidos analisados, com maior expressão em raiz e folha. Por outro lado, os genes *TcPR-1d e TcPR-1l* possuem maior nível de expressão, sendo que ambos possuem expressão majoritária em raiz e caule (Figura 5).

4. CONCLUSÃO

Os experimentos de qPCR comprovaram que os genes *TcPR-1c, TcPR-1d e TcPR-1l* são diferencialmente expressos nos tecidos analisados: caule, folha e raiz. O gene *TcPR-1c* possui maior expressão em raiz e folha, enquanto que o genes *TcPR-1d e TcPR-1l* possuem expressão



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

majoritária em raiz e caule. Dentre os genes analisados o gene *TcPR-1c* foi o que se mostrou com menor expressão nos tecidos analisados, porém sua expressão é altamente induzida pela interação cacau-*M.perniciosa* (tabela 1), esse drástico aumento de expressão pode sugerir uma importância para o gene *TcPR-1c* na defesa vegetal, no patossistema e no estudo de seu promotor para futuros ensaios de transgenia.

5. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao CNPq pela bolsa concedida e ao pesquisador e diretor do Centro de Recursos Genéticos (IAC) Dr. Carlos Colombo por disponibilizar seu laboratório onde foi realizado parte dos experimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Evolution**, 215, 403-410.
- Argout, X. *et al.* The genome of theobroma cacao. **Nature Genetics**, n.43,p.101-108, 2011.
- Braun BR, Head WS, Wang MX, Johnson AD (2000) Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. **Genetics** 156: 31-44.
- Cornelissen, JB. Van Huijsduijnen, RA. Van Loon, LC. Bol, JF. Molecular characterization of messenger RNAs for “pathogenesis related” proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV infection of tobacco. **The EMBO Journal** 19865, no. 37–40.
- Emanuelsson, O. *et al.* Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols** 2:953-971 (2007).
- Evans, H.C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches’ broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society** 74, no. 3: 515-523. doi:10.1016/S0007-1536(80)80051-9.
- Frias, GA. Purdy, LH. And Schmidt, RA. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **PlantDisease**. 1991. 75(6): 552-556.
- Kilaru, A. and Hasenstein, KH. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosa* on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**. 2005. 95: 101-107.
- Meinhardt, Lyndel W., Johana Rincones, Bryan A. Bailey, M. Catherine Aime, Gareth W. Griffith, Dapeng Zhang, and Gonçalo A. G. Pereira. 2008. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches’ broom disease of cacao : what’s new from this old foe ? **Molecular PlantPathology** 9, no. 5: 577-588. doi:10.1111/J.1364-3703.2008.00496.X.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud, C. (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity** 89, 380 – 386.
- Purdy LH, Schmidt RA (1996) Status of cacao witches’ broom: biology, epidemiology, and management. **Annu Rev Phytopathol** 34: 573-594.
- Schuren, *et al.* The Sc7/Sc14 gene family of *Schizophyllum commune* codes for extracellular proteins specifically expressed during fruit-body formation. **J. Gen. Microbiol.** 1993. 139: 2083–2090.
- Teixeira, P.J.L. Costa, G.G.L. Fiorin, G.L. Pereira G.A.G. Mondego, J.M.C **Novel receptor-like kinases in cacao contain PR-1 extracellular domains**. DOI: 10.1111/mpp.12028. 2012.
- Van Loon L.C., Van Strien EA. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 55:85–97
- Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M. (2006) Significance of inducible defense related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** 44, 135–162.
- Wheeler, B.E.J. The growth of *Crinipellis perniciosa* in living and dead cocoa tissue. **Symp Ser Br Mycol Soc.** 1985. 10: 103-116.