



## Análise do Acúmulo de Transcritos do Gene *LRR1* em Feijão em Resposta ao Crestamento Bacteriano Comum

### RESUMO

**Débora Regiane Gobatto**  
[Deboragobatto@hotmail.com](mailto:Deboragobatto@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Taciane Finatto**  
[tfinatto@gmail.com](mailto:tfinatto@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Rosângela Dallemole Giaretta**  
[giaretta@utfpr.edu.br](mailto:giaretta@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

**Katiane Fedrigo**  
[katianefedrigo@hotmail.com](mailto:katianefedrigo@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

O objetivo foi avaliar o acúmulo de transcritos do gene *LRR1* em genótipos de feijão contrastantes para a resposta ao crestamento bacteriano comum (CBC). Inicialmente foi realizado isolamento da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em laboratório. Em casa de vegetação foi conduzido experimento utilizando duas cultivares de feijão: IAC Milênio (moderadamente resistente ao CBC) e IPR Colibri (suscetível ao CBC), submetidas a três condições: plantas com ferimento e inoculadas, plantas feridas e não inoculadas e plantas sem ferimento e não inoculadas. Para inoculação foi utilizado o método das agulhas múltiplas. O material vegetal utilizado para a análise do acúmulo de transcritos foi coletado imediatamente antes da inoculação da bactéria (tempo 0 horas) e 72 horas após a inoculação (tempo 72 horas). Inicialmente foi realizada extração do RNA total, posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA a partir do mRNA, seguido de reação de PCR com iniciadores específicos para o gene *Act* - codificador da actina como referência, e do gene alvo *LRR1*, ambos de *Phaseolus vulgaris* L. O perfil de acúmulo de transcritos foi avaliado. O gene *LRR1* apresentou diferente perfil transcricional entre cultivares. IAC Milênio, moderadamente resistente ao crestamento bacteriano comum, apresenta um acúmulo relativo de transcritos menor que IPR Colibri, suscetível à doença. IPR Colibri apresenta grande aumento do acúmulo de transcritos do gene *LRR1*, mostrando uma rápida resposta da planta à presença da bactéria. O acúmulo de transcritos do gene *LRR1*, sozinho, não é responsável pela característica da cultivar IAC Milênio de moderadamente resistente ao crestamento bacteriano comum.

**PALAVRAS-CHAVE:** *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Perfil transcricional. Tolerância.

## INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é importante constituinte da alimentação humana por ser rico em proteínas (FAO, 2015). O Brasil é um importante produtor deste alimento (FAO, 2017), porém, essa produção pode ser afetada pela presença de patógenos, como a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano comum (CBC). A doença melhor se desenvolve em condições de clima quente e úmido, causando lesões foliares reconhecidas, inicialmente pelo aspecto encharcado, passando a manchas necróticas com halo amarelo, presentes, principalmente nas bordas dos folíolos. No caule e vagens, as lesões, inicialmente, são encharcadas e tornam-se avermelhadas. As sementes podem ser atingidas e não apresentar sintomas, ou podem apresentar descoloração no hilo, manchas amarelas no tegumento, enrugamento e má formação (BIANCHINI, et al., 2005).

Como forma de defesa, as plantas ativam cascatas de sinalização que aumentam ou suprimem a expressão gênica (ALVES, et al., 2013). Esse mecanismo adaptativo possui uma resposta cinética rápida, que permite que a célula altere rapidamente sua capacidade transcricional na presença do estresse, e volte ao estado inicial quando o estresse for removido (NADAL, et al., 2011).

Os genes R são receptores intracelulares com domínio *LRR* (*leucine-rich-repeats*), que ao perceberem a presença de moléculas efetoras liberadas por alguns patógenos, entre eles *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, ativam rotas de sinalização da planta, associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, fosforilação de proteínas e ativação transcricional de vários genes de defesa e na resposta de hipersensibilidade (XIAO, et al., 2008). Desta forma, mutações nas sequências codificadoras ou promotoras dos genes *LRR* podem alterar seus níveis de expressão e impedir o reconhecimento do patógeno.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar ao acúmulo de transcritos do gene *LRR1* em genótipos de feijão contrastantes para resposta ao crestamento bacteriano comum.

## METODOLOGIA

O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando o delineamento de blocos ao acaso com três repetições. Foram utilizadas três condições: plantas com ferimento e inoculadas, plantas feridas e não inoculadas e plantas sem ferimento e não inoculadas; duas cultivares de feijão: IAC Milênio (moderadamente resistente ao crestamento bacteriano comum) e IPR Colibri (suscetível ao crestamento bacteriano comum), plantadas em vasos de 5L, com adubação conforme a recomendação para a cultura.

O isolamento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi realizado a partir de folhas de feijão que apresentavam a doença a campo, sendo preparada a suspensão bacteriana que foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura batata-sacarose-ágar (BSA), que foram mantidas em B.O.D. a 28 °C, durante 48 horas. Após repicagem e obtenção das colônias puras, a suspensão bacteriana foi calibrada para inoculação em OD<sub>600</sub> = 0,5.

No momento da inoculação do patógeno foram realizados ferimentos em dois folíolos de cada planta, pelo método de agulhas múltiplas, utilizando cinco agulhas cravadas equidistantes numa rolha de 2 cm de diâmetro. Os folíolos da folha de cada planta de feijão foram colocados sobre uma placa de Petri contendo algodão esterilizado e umedecido com a suspensão bacteriana, pressionando-se o conjunto de agulhas sobre a folha. As plantas com tratamento

não inoculadas, mas com fermento, foram feridas pelas agulhas, como descrito anteriormente, porém, o algodão estava umedecido com água, sem o inoculo. As plantas controle, não receberam o inoculo e nem foram feridas.

O material vegetal (folhas) utilizado para a análise do acúmulo de transcritos foi coletado em nitrogênio líquido imediatamente antes da inoculação da bactéria (tempo 0 horas) e 72 horas após a inoculação (tempo 72 horas). Dessas amostras coletadas, foi extraído o RNA total, macerando-se 1 mg de cada amostra em almofariz com nitrogênio líquido. As amostras maceradas foram transferidas para microtubos de 2 mL, tendo-se o cuidado para não descongelarem por nenhum instante até a adição de 1 mL de Quick-zol®, seguindo o protocolo do fabricante.

Foi analisada a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose 1%. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro, sendo feitas leituras da absorbância (OD) a 260 e 280 nm, a partir das quais foi calculada a concentração do RNA em ng/μL.

O RNA de cada amostra foi tratado com a enzima DNase I® (Thermo Fisher Scientific), para eliminação do DNA. Foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA a partir de 2μg de RNA com a enzima transcriptase reversa (RT) com o uso do iniciador Oligod(dT) utilizando o kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de PCR foi realizada em termociclador. Para a amplificação dos genes referência *Act* (actina – *Phvul.007G129000.1*) e do gene alvo *LRR1* (*leucine-rich repeat - Phvul.001G014400.1*) foi realizada uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, e ao final, uma extensão de 72°C por 10 minutos. As temperaturas de anelamento foram as específicas para cada par de iniciador. Ao final da reação, o produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com Gel Red® (Biotium), durante 2 horas a 80 V. Após a corrida, os géis foram observados em transiluminador e fotodocumentados. A partir das imagens dos géis, o perfil de acúmulo de transcritos foi avaliado pela densitometria das bandas usando o software ImageJ.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para extração de RNA foi eficiente, pois o RNA extraído é de boa qualidade, com razão entre as absorbâncias 260/280 menor ou igual a 2, mostrando que não houve contaminação durante o processo de extração.

O gene escolhido com referência *Act* foi eficiente, pois nos tratamentos em que houve amplificação, se manteve estável.

O gene alvo *LRR1* revelou diferença entre as cultivares analisadas (Figura 1). É possível notar que a cultivar 1 (IAC Milênio), moderadamente resistente ao cretamento bacteriano comum, apresenta um acúmulo relativo de transcritos menor que na cultivar suscetível à doença. IPR Colibri (suscetível ao CBC) apresenta grande aumento do acúmulo de transcritos do gene *LRR1*, mostrando uma rápida resposta da planta à presença da bactéria.

Assim, percebe-se que o acúmulo de transcritos apenas do gene *LRR1* não é suficiente para que a planta tolere a presença do isolado da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* testado, podendo estar associado com a defesa da planta quando atacada pela bactéria com uma virulência diferente, ou mesmo, ser responsável pela tolerância ao ataque de outros patógenos, que não *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

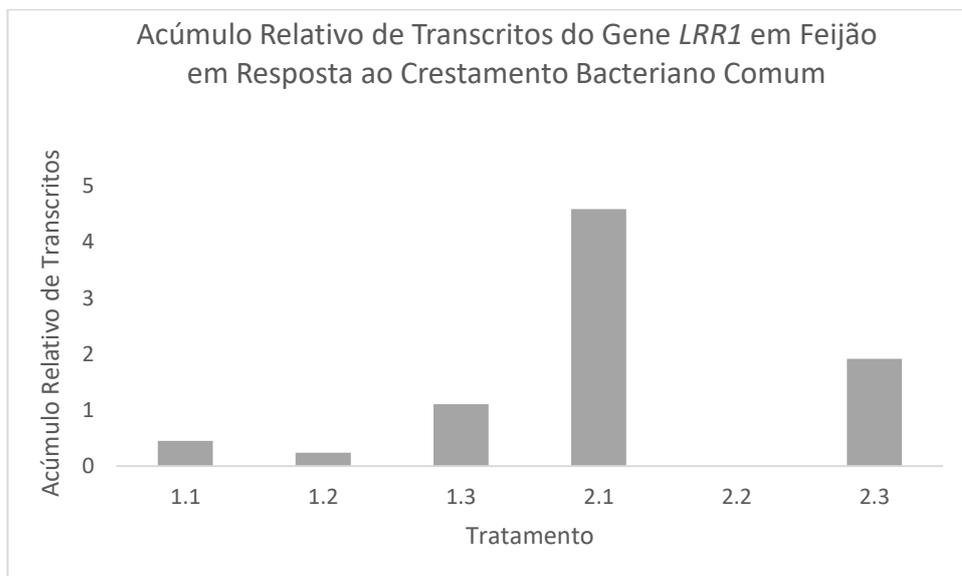


Figura 1 - Acúmulo Relativo de Transcritos do Gene *LRR1* em Feijão em Resposta ao Crestamento Bacteriano Comum. Tratamentos: 1º algarismo = cultivar (1 = IAC Milênio e 2 = IPR Colibri), 2º algarismo = condição (1 = plantas feridas e inoculadas, 2 = plantas feridas e não inoculadas e 3 = plantas não inoculadas nem feridas)

A família de genes *LRR* é composta por centenas de genes, sendo que, a defesa à *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode estar relacionada a outro gene, que não o *LRR1*, responsável por desencadear a sinalização do ataque da bactéria, ativando os mecanismos de defesa, que tornam a cultivar IAC Milênio moderadamente resistente ao CBC.

Assim, destaca-se a importância de outros genes da família *LRR* serem estudados em feijão, para que se tenha conhecimento exato de qual é o gene responsável pela característica de moderadamente resistente ao crestamento bacteriano comum na cultivar IAC Milênio, para que futuros programas de melhoramento de plantas usem dessa informação para obtenção de cultivares que não sofram com essa doença tão importante para a cultura do feijão.

## CONCLUSÃO

O acúmulo de transcritos do gene *LRR1*, sozinho, não é responsável pela característica da cultivar IAC Milênio de moderadamente resistente ao crestamento bacteriano comum.

## Analysis of the Accumulation of *LRR1* Gene Transcripts in Bean in Response to Common Bacterial Blight

### ABSTRACT

The objective was to evaluate the accumulation of *LRR1* gene transcripts in contrasting bean genotypes in response to common bacterial blight (CBB). Isolation of the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in laboratory. The experiment was carried out using two bean cultivars: IAC Milênio (moderately resistant to CBB) and IPR Colibri (susceptible to CBB), submitted to three conditions: wounded and inoculated plants, injured and uninoculated plants and uninjured plants and not inoculated. For inoculation, the multiple needles method was used. The plant material used for the analysis of the accumulation of transcripts was collected immediately before inoculation of the bacterium (time 0 hours) and 72 hours after inoculation (time 72 hours). Initially extraction of the total RNA was performed, then cDNA synthesis was performed from the mRNA, followed by PCR reaction with specific primers for the actin - encoding gene as reference, and the *LRR1* target gene, both from *Phaseolus vulgaris* L. The accumulation profile of transcripts was evaluated. The *LRR1* gene presented a different transcriptional profile among cultivars. IAC Milênio, moderately resistant to common bacterial blight, presents a relative accumulation of transcripts lower than IPR Colibri, susceptible to the disease. IPR Colibri, shows a large increase in the accumulation of *LRR1* gene transcripts, showing a rapid response of the plant to the presence of the bacterium. The accumulation of transcripts of the *LRR1* gene, alone, is not responsible for the characteristic of the cultivar IAC Milênio of moderately resistant to common bacterial blight.

**KEYWORDS:** *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Transcriptional profile. Tolerance.

---

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UTFPR pela oportunidade da pesquisa, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2015 - About the International Year of Pulses. Disponível em: < <http://www.fao.org/pulses-2016/en/>>. Acesso em: 03 ago 2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 04 ago 2017.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorin, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. São Paulo: Editora Ceres, p. 376-399, 2005.

ALVES, M.S.; DADALTO, S.P.; GONÇALVES, A.B.; SOUZA, G.B. de; BARROS, V.A.; FIETTO, L.G. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.14, p.7815-7828, 2013.

NADAL, E. DE; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v.12, 2011.

XIAO, S.; WANG, W.; YANG, X. **Evolution of resistance genes in plants**. Innate immunity of plants, animals and humans. *Nucleic Acids and Molecular Biology*, v. 21, p. 1-25, 2008.

**Recebido:** 31 ago. 2017.

**Aprovado:** 02 out. 2017.

**Como citar:**

GOBATTO, D. R.. et al. Análise do Acúmulo de Transcritos do Gene *LRR1* em Feijão em Resposta ao Crestamento Bacteriano Comum. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

**Correspondência:**

Débora Regiane Gobatto  
Linha São Donato, Zona rural, Vitorino, Paraná, Brasil.

**Direito autoral:**

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

