

PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES ESSENCIAIS AO FUNGO *Phakopsora pachyrhizi* CAUSADOR DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

RINCÃO, M.P.¹; CRUZ, B.G.²; YOKOYAMA, A.²; KUWAHARA, M.K.²; ABDELNOOR, R.V.²; MARCELINO-GUIMARAES, F.C.². ¹Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina-PR, e-mail: ximelles@hotmail.com; ²Embrapa Soja, Londrina - PR.

Dentre as culturas agronômicas de importância no Brasil, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa um lugar de grande destaque, sendo responsável por aproximadamente 49% da produção nacional de grãos (CONAB, 2015). A ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow é uma das várias doenças que acometem a cultura da soja, apresentando grande potencial destrutivo para as lavouras. Em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, os danos causados pela doença podem alcançar 80% da produção, reflexos da desfolha precoce, incompleta formação de grãos e consequente redução da produtividade (SOARES et al., 2004; YORINORI et al., 2005).

Assim como todos os organismos eucariotos, os fungos compartilham um conjunto gênico derivado de um ancestral comum, que pode manter-se conservado dentro de linhagens existentes. Nesse conjunto conservado encontra-se a maioria dos genes que são essenciais para a sobrevivência de um organismo, tais como os envolvidos no metabolismo primário, por exemplo, em vias de biossíntese de aminoácidos e vitaminas, e produção de energia; e ao metabolismo secundário, por meio de genes que codificam transportadores de membrana, sinalização de vias metabólicas e outras atividades essenciais à sobrevivência do patógeno. Compreender a organização e a funcionalidade destes genes, bem como as vias metabólicas nas quais atuam, é de grande importância para o melhor entendimento da interação molecular necessária à patogenicidade e, conseqüentemente, vislumbrar potenciais alternativas biotecnológicas para o controle da doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de expressão de genes potencialmente essenciais para a sobrevivência de *P. pachyrhizi*.

Os genes supostamente envolvidos em mecanismos basais de sobrevivência e na patogenicidade de *P. pachyrhizi* foram selecionados com base em genes ortólogos de outros fungos causadores de ferrugem, identificados a partir da literatura de acordo com o seu papel na interação biotrófica, bem como em função dos níveis de expressão em um banco local de transcriptoma do fungo, gerado com transcritos expressos durante a interação com a soja. Foram selecionados 13 genes potencialmente necessários aos principais estádios de desenvolvimento da infecção, como germinação de esporos, formação de tubo germinativo, desenvolvimento de apressório, formação de haustório e esporulação.

Para verificar o perfil de expressão via qRT-PCR foram desenhados *primers* específicos com base no sequenciamento prévio dos transcritos de *P. pachyrhizi* e em pesquisas de homologia entre genes ortólogos de outros fungos da ferrugem, obtidos a partir do banco de dados do NCBI. O perfil de expressão foi avaliado em duas condições:

Crescimento in vitro: esporos e esporos germinados foram obtidos a partir do cultivo de esporos frescos de *P. pachyrhizi* em placas de Petri contendo solução de água com adição de 0,04% de Tween. O cultivo *in vitro* destes esporos foi utilizado para observar o perfil de expressão dos genes de interesse antes do contato do patógeno com a planta hospedeira e antes que o processo de infecção se estabelecesse na planta.

Crescimento in vivo: plantas de soja suscetíveis a *P. pachyrhizi* (cultivar Williams82) foram mantidas em casa de vegetação para inoculação do patógeno e

posterior coleta das amostras. A inoculação foi realizada utilizando o isolado monospórico LUB112 de *P. pachyrhizi*, obtido no Laboratório de Biotecnologia e Bioinformática da Embrapa Soja. A inoculação foi realizada por meio de solução de água com adição de 0,04% de Tween contendo 10^4 esporos.mL⁻¹. Folhas infectadas dessas interações compatíveis foram coletadas em diferentes períodos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas após a inoculação “hai”) a fim de representar a progressão da infecção e colonização do tecido hospedeiro pelo fungo. Uma vez coletados, fungo e planta foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, constituído por três repetições biológicas contendo três replicatas cada.

O RNA total foi extraído a partir de amostras congeladas da planta e do fungo usando o kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), enquanto o cDNA foi sintetizado utilizando o kit *Super Script III First Strand* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando o aparelho *StepOnePlus™* (Applied Biosystems). Três controles negativos foram utilizados para assegurar que somente o cDNA de *P. pachyrhizi* foi amplificado. A eficiência dos *primers* foi calculada com base na equação $[10^{(-1/\text{slope})}]-1$. Cada reação de qRT-PCR foi realizada em triplicata e a especificidade dos produtos da amplificação foi validada pela análise da curva de dissociação. A quantificação relativa dos genes de interesse foi calculada segundo Pfaffl (2001) pela equação $2^{-\Delta Ct}$. O gene endógeno beta-tubulina do patógeno foi utilizado como normalizador.

Os resultados obtidos revelaram que, dentre os 13 genes selecionados, apenas três apresentaram um perfil transcricional induzido durante o processo de infecção da soja pelo fungo *P. pachyrhizi*: as sequências 595, 4692 e 4668, que codificam a proteína tiamina sintase, a proteína G – subunidade alfa (pG α), e a enzima peptidil prolil isomerase (PPI), respectivamente (Tabela 1).

A tiamina, também chamada de vitamina B1, é um componente essencial de várias enzimas envolvidas no metabolismo primário de aminoácidos. É essencial ao fungo para a germinação do esporo e, principalmente, para a maturação do haustório e até o final do processo de infecção, apresentando altos níveis de expressão nestes estádios de desenvolvimento da doença (HAHN & MENDGEN, 1997). Na interação soja x *P. pachyrhizi*, o gene que codifica a proteína tiamina sintase, sequência 595, apresentou perfil de expressão semelhante, com gradual aumento nos níveis de expressão a partir de 6 hai (desenvolvimento de tubo germinativo e de apressório) até 192 hai (esporulação).

O papel desempenhado pela proteína pG α ainda não foi totalmente elucidado, porém trabalhos anteriores sugerem que essa enzima desempenha papel fundamental na regulação de vias de sinalização cruciais para a formação de apressório, penetração de tecidos do hospedeiro e formação do haustório. A sequência 4692, que codifica a proteína pG α , foi induzida nos tempos de 0 a 24 hai, que envolveu as fases de germinação de esporo, formação de apressório, penetração do tecido do hospedeiro, e formação de haustório, apresentando posteriormente uma gradual diminuição dos níveis de expressão. Resultados semelhantes foram observados para ferrugem do café, nos quais foram observados dois picos de expressão, durante a germinação de esporos e em uma fase precoce do processo de infecção (VIEIRA et al., 2012).

Por fim, a sequência 4668 apresentou maior indução após o período de 12 hai, com gradual aumento dos níveis de expressão até 192 hai. Esta sequência codifica a enzima PPI que catalisa a isomerização das ligações peptídicas, auxiliando no dobramento de proteínas. O perfil transcricional deste gene foi similar em outros estudos, apresentando acúmulo em estruturas de infecção a partir de 12 hai a 18 hai, com picos acentuados no haustório e em folha infectada (HAHN & MENDGEN, 1997).

Assim, o perfil transcricional observado para esses três genes corrobora os resultados observados em trabalhos anteriores que utilizaram outros fungos de ferrugem (VIEIRA et al., 2012; HAHN & MENDGEN, 1997).

As demais sequências não apresentaram indução em nenhum momento do período de infecção da planta pelo patógeno. Este resultado pode ser decorrente do fato de que as sequências resultantes das pesquisas de homologia podem não ser necessariamente as sequências relacionadas aos genes de interesse, uma vez que o genoma de *P. pachyrhizi* não é conhecido por completo e as sequências utilizadas podem não corresponder à sequência completa dos genes. Vieira et al. (2012) observou diferenças no perfil transcricional de alguns genes quando comparados entre isolados distintos da ferrugem do café. Assim, também seria possível que alguns genes utilizados neste trabalho se comportem de maneira diferente quando analisados em relação a diferentes isolados.

Referências

- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira grãos**, v.2 – Safra 2014/15, n.5 – Quinto Levantamento. Brasília: CONAB, 2015. 116p.
- HAHN, M.; KURT, M. Characterization of In planta–induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 4, p. 427-437, 1997.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- SOARES, R. M.; RUBIN, S. A. L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1245-1247, 2004.
- VIEIRA, A.; TALHINHAS, P.; LOUREIRO, A.; THÜRICH, J.; DUPLESSIS, S.; FERNANDEZ, D.; SILVA, M. C.; PAULO, O. S.; AZINHEIRA, H. G. expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 261-277, 2012.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES-JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 4, p. 675-677, 2005.

Tabela 1. Valores de expressão relativa de genes potencialmente essenciais de *P. pachyrhizi* durante a interação com a soja.

Codificação das sequências ^a	Anotação	Períodos de infecção da planta pelo patógeno (hai)									
		ES ^b	EG ^b	0	6	12	24	48	72	96	192
de_novo_595	Tiamina sintase	0.04	0.03	0.10	0.04	0.33	0.13	0.61	0.94	1.11	2.36
de_novo_4692	pGα	0.26	0.23	7.67	1.07	3.03	1.15	0.73	0.58	0.40	0.46
de_novo_4668	PPI	0.55	1.24	0.19	0.19	2.58	2.71	2.13	2.81	3.38	3.30

^acodificação das sequências de *P. pachyrhizi* no banco de dados internos da Embrapa Soja.

^b ES e EG= esporo e esporo germinado, respectivamente.