



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CYNARA CASSANDRI TEIXEIRA ROMERO

**AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA
INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E
O FUNGO *Uromyces appendiculatus***

LONDRINA
2011



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Cynara Cassandri Teixeira Romero

**Avaliações microscópicas e moleculares da interação incompatível
entre plantas de soja e o fungo *Uromyces appendiculatus***

Londrina

2011

CYNARA CASSANDRI TEIXEIRA ROMERO

**AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA
INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E
O FUNGO *Uromyces appendiculatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Vilela
Abdelnoor

Co-orientadora: Dr^a Renata Stolf-Moreira

LONDRINA
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R763a Romero, Cynara Cassandri Teixeira..
Avaliações microscópicas e moleculares da interação incompatível entre plantas
de soja e o fungo *Uromyces appendiculatus* / Cynara Cassandri Teixeira Romero.
– Londrina, 2011.
iv, 82 f. : il.

Orientador: Ricardo Vilela Abdelnoor.
Co-orientador: Renata Stolf Moreira.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Resistência a doenças e pragas –
Teses. 3. Soja – Genética – Expressão – Teses. 4. Soja – Ferrugem asiática – Teses. I.
Abdelnoor, Ricardo Vilela. II. Moreira, Renata Stolf. III. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 631.52:633.34

CYNARA CASSANDRI TEIXEIRA ROMERO

**AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA
INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E
O FUNGO *Uromyces appendiculatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor
Embrapa Soja

Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
IAPAR/Embrapa Café

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira
Universidade Federal da Grande Dourados

Londrina, 17 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho à minha mãe, Roseli, que sempre me deu os melhores exemplos e nunca mediu esforços para que eu pudesse chegar onde estou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e à Embrapa Soja, por me proporcionarem as condições necessárias para a realização deste trabalho;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro imprescindível;

Ao Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor, por ter prontamente aceito meu pedido de orientação e me recebido em seu laboratório, pela orientação no trabalho, pelas críticas e pelo exemplo profissional;

À minha co-orientadora, Dra. Renata Stolf Moreira, pela orientação, colaboração, correções, paciência e amizade;

Aos pesquisadores da Embrapa Soja Dra. Francismar Corrêa Marcelino, Dra. Claudine Dinali Santos Seixas e Dr. Eliseu Binneck, pelas sugestões no decorrer do trabalho;

Aos queridos amigos MSc. Lara Isys Dias e Dr. Rafael Dias, os principais incentivadores da minha vinda para Londrina;

Aos amigos Lizandra Lucy Catelli e Salvador Lima Brito Jr., que tanto me ajudaram desde as etapas iniciais do trabalho, e que de certa forma também foram meus orientadores, sempre prontos a atender às minhas dúvidas;

À minha amiga Euziane Joana Lino, companheira de mestrado e de laboratório, que me ensinou boa parte do que aprendi nesses últimos meses, sempre com uma paciência notável; obrigada Zi, sem você eu não teria conseguido!

Aos Drs. Beatriz Barros, Fabiana Rodrigues, Mayra Carvalho e Rodrigo Matheus Pereira, por compartilharem suas experiências, pelos bons conselhos, conversas, risadas e auxílio prestado ao longo desses dois anos de convivência;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, por sempre me ajudarem e tornarem agradável e divertida a rotina de laboratório: Adriana Polizel, Amanda Paiva, André Passianotto, César Silveira, Cibelle Engels, Edgar Mitani, Elton Gargioni, Gislaine Vasquez, Idenize Orsini, João Vitor

Maldonado, Juliane Marinho, Juliana Leite, Juliana Marcolino, Kleber Miranda, Larissa Giroto, Lívia Nogueira, Lucas Soares, Maísa Pinheiro, Márcia Kamogae, Maria Cecília, Mayla Molinari, Michelle Rincão, Nilson Vieira, Paula Camargo, Paulo Camargo, Paulo Silla, Renata Fuganti, Selma Pereira (*in memorian*), Silvana Rockenbach Marin, Tânia Hitomi (*in memorian*), Thiago Nakayama, Valéria Lopes e Vera Lúcia Pierotte;

Às mulheres responsáveis pelo meu sucesso:

Minha avó Jacira Martins Gaspar, pelo carinho, força de vontade e energia inabaláveis, e principalmente por ser um grande exemplo de mulher batalhadora;

Minha mãe Roseli de Lourdes Teixeira, meu maior exemplo de dedicação e conduta, pelo carinho, esforço, empenho, apoio e paciência;

Minhas tias Marli e Maria Luci, e minha irmã Sara, sempre presentes, pelos bons conselhos, incentivo e ajuda;

As amigas Ane Carolina, Lorena Lenara, Juliana Paukowski, Simone Foss, Cléo Laurindo, Paula Carvalho e Daniele Carolina, que, longe ou perto, sempre me incentivaram e garantiram suporte emocional;

Todo o meu carinho e eterno agradecimento!

“Em algum lugar, algo incrível espera para ser conhecido.”
(Carl Sagan)

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. A Cultura da Soja no Brasil	5
2.2. Ferrugem Asiática da Soja: Perdas Econômicas e Métodos de Controle ...	6
2.3. Os Fungos de Ferrugem	7
2.4. O Processo de Penetração Fúngica no Tecido Vegetal	8
2.5. Bases Genéticas da Resistência	9
2.6. Tipos de Resistência a Patógenos em Plantas.....	11
2.6.1. Defesas pré-formadas	14
2.6.2. Mecanismos de defesa induzíveis e componentes de sinalização	15
2.7. Resistência Não-Hospedeira	16
2.7.1. Tipos de resistência não-hospedeira.....	17
2.7.2. Genes de resistência não-hospedeira	19
2.8. Similaridades entre Resistências Gene-a-Gene e Não-Hospedeira	20
2.9. Genômica Funcional	21
2.9.1. Hibridização Subtrativa Supressiva	22
2.10. RT-PCR quantitativo.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E O FUNGO <i>Uromyces appendiculatus</i>	41
RESUMO:.....	41
SUMMARY:	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS	46
<i>Material biológico e delineamento experimental</i>	46

<i>Preparo dos inóculos e inoculação</i>	46
<i>Coletas das amostras</i>	46
<i>Análises microscópicas</i>	47
<i>Construção das Bibliotecas Subtrativas</i>	48
<i>Sequenciamento e análise de bioinformática</i>	49
<i>Análise da expressão gênica por qRT-PCR</i>	50
RESULTADOS e DISCUSSÃO	53
<i>Análises Fenotípicas</i>	53
<i>Análises Moleculares</i>	56
<i>Genes Envolvidos em Processos Relacionados à Defesa Contra Patógenos</i>	59
<i>Genes Relacionados à Resistência Não-Hospedeira</i>	66
<i>Possíveis novos genes encontrados neste estudo</i>	72
CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	3
Figura 1: Modelo para a resistência não-hospedeira do tipo I e do tipo II.....	19
Figura 2: Esquema do processo de Hibridização Subtrativa.....	24
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E O FUNGO <i>Uromyces appendiculatus</i>	41
Figura 1: Montagem do experimento	47
Figura 2: Esquema do agrupamento dos tempos para montagem dos “bulks” e construção das bibliotecas subtrativas.....	49
Figura 3: Valores de estabilidade da expressão (M) dos genes endógenos.....	51
Figura 4: Análises macroscópicas.....	53
Figura 5: Análises microscópicas em folhas de soja.....	54
Figura 6: Análises microscópicas em folhas de feijão.....	56
Figura 7: Números totais de contigs e unissequências distribuídas por biblioteca subtrativa	57
Figura 8: Número de contigs e unissequências obtidas nas bibliotecas subtrativas	58
Figura 9: Distribuição das principais classes de enzimas nas três bibliotecas subtrativas.....	59
Figura 10: Principais classes de transcritos encontrados	60
Figura 12: Níveis de expressão dos genes	68
Figura 13: Modelo proposto para a atuação conjunta de PEN2 e PEN3	70

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para validação dos genes selecionados, com os respectivos Glyma que serviram de modelo, tamanho do amplicon (em pares de bases) e eficiência da reação de qRT-PCR.....	51
Tabela 2: Informações sobre o sequenciamento das bibliotecas.....	57
Tabela 3: Presença de sequências gênicas relacionadas a proteínas envolvidas em vias metabólicas de respostas de defesa de plantas ao ataque de patógenos.	62
Tabela 4: Genes envolvidos no mecanismo de resistência não-hospedeira, cujas sequências melhor se alinham com sequências geradas nas bibliotecas subtrativas. Blastn realizado em 09/2010	67

ROMERO, Cynara Cassandri Teixeira. **Avaliações Microscópicas e Moleculares da Interação Incompatível entre Plantas de Soja e o Fungo *Uromyces appendiculatus***. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2011.

RESUMO

As plantas estão naturalmente expostas a uma ampla variedade de micro-organismos potencialmente patogênicos, mas, graças ao fenômeno conhecido como resistência não-hospedeira, apenas uma ínfima parcela destes lhes causa danos. A resistência não-hospedeira é sabidamente a forma mais comum e duradoura de resistência, porém, devido a sua natureza complexa, tem sido menos estudada ao longo dos anos do que a resistência específica. Acredita-se que o entendimento das bases moleculares da resistência não-hospedeira, com o auxílio das técnicas modernas de biologia molecular, possa trazer contribuições para o desenvolvimento de variedades de plantas resistentes a doenças. A cultura da soja ocupa lugar de destaque no agronegócio brasileiro, mas sofre anualmente prejuízos da ordem de milhões de reais devido ao ataque do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da Ferrugem Asiática da Soja (FAS). O presente trabalho se propôs a investigar fenotípica e molecularmente a interação de plantas de soja com o fungo heterólogo *Uromyces appendiculatus*, causador da ferrugem do feijoeiro. As análises fenotípicas, feitas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, sugerem a tentativa mal sucedida de penetração fúngica no tecido vegetal, e classificam tal interação não-hospedeira como “tipo I”, uma vez que não foi observada qualquer reação de hipersensibilidade. Para os estudos moleculares foram construídas bibliotecas subtrativas de cDNA, cujos transcritos foram seqüenciados utilizando a plataforma Solexa, e analisados quanto a sua participação em vias de defesa contra patógenos. Além de genes-chave para essas vias, foi detectada a expressão de genes relacionados à resistência não-hospedeira. Análises de expressão por qRT-PCR mostraram a superexpressão de *PEN2* e *PEN3* 72 horas após a inoculação; ambos os genes podem estar atuando em cooperação em um mecanismo de defesa pré-invasão, que envolve o transporte de substâncias tóxicas até a membrana plasmática em sítios de tentativa de penetração. Outro gene, *Bl-1*, que desempenha um papel importante na rota de resposta do retículo endoplasmático ao estresse, teve sua superexpressão detectada nas horas iniciais de inoculação.

Palavras-chave: Resistência Não-hospedeira, Soja, Ferrugem Asiática

ROMERO, Cynara Cassandri Teixeira. **Microscopic and Molecular Analysis of the Incompatible Interaction between Soybean Plants and the Fungus *Uromyces appendiculatus***. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2011.

ABSTRACT

Plants are naturally exposed to a vast range of potentially pathogenic microorganisms, but due to the phenomenon known as non-host resistance, only a small part of them are able to cause damages. Non-host resistance is the most durable and common type of resistance, however, due to its complex nature, has been less studied over the years than the specific resistance. Understanding the molecular basis of non-host resistance, with the support of modern molecular biology techniques, may provide contributions to the development of resistance in plants to a variety of pathogens. Soybean crop is very important to Brazilian agribusiness, but the presence of *Phakopsora pachyrhizi* fungus, causal agent of Asian Soybean Rust (ASR), has resulted in losses of millions of dollars every year. The current study aimed to investigate the phenotypical and molecular interaction between soybean and the heterologous fungus *Uromyces appendiculatus*, causer of common bean rust. Phenotypic analyses, by optical and scanning electron microscopy, suggests the unsuccessful attempt to fungal penetration in soybean tissue, and classify this incompatible interaction as “type I” non-host resistance. For molecular studies, cDNA subtractive libraries were constructed, and the resulting transcripts were sequenced using Solexa technology and analyzed for their role in pathways related to defense against pathogens in plants. Additionally, the expression of non-host resistance genes was also detected. qRT-PCR analysis showed the overexpression of *PEN2* and *PEN3* genes 72 hours after inoculation; both genes appears to work in co-operation in a pre-invasion defense mechanism which involves traffic of toxic compounds to the plasma membrane at sites of attempted invasion. The *BI-1* gene plays an important role in the conserved endoplasmic reticulum stress response pathway to modulate cell death, and was overexpressed in the initial hours of infection.

Key words: Nonhost Resistance. Soybean. Asian Rust.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Mundialmente, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a leguminosa de maior importância econômica. Em comparação com outras grandes culturas, é a que mais tem crescido nos últimos anos, com um aumento estimado em 700% nas últimas três décadas. No Brasil, tornou-se uma *commodity* agrícola de destaque: o país é o segundo maior produtor e exportador mundial. Existem perspectivas de que o Brasil atinja o posto de principal produtor mundial, atualmente ocupado pelos Estados Unidos, já nos próximos anos, uma vez que possui ainda grande potencial de expansão da área cultivada.

Apesar do significativo crescimento da produção, diversos fatores bióticos e abióticos ocasionam perdas significativas de produtividade. Atualmente, uma das principais doenças que afeta as lavouras de soja nos países produtores da cultura é a Ferrugem Asiática da Soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Estratégias tradicionais de melhoramento, até agora, têm proporcionado variedades com resistência a raças particulares do patógeno. O fato de não existirem cultivares com resistência genética efetiva acaba exigindo a aplicação massiva de fungicidas para o controle da doença – medida que além de onerar a produção pode causar danos ambientais. Portanto, programas de melhoramento que visem a obtenção de cultivares com resistência efetiva e duradoura ao patógeno são de suma importância.

A resistência não-hospedeira é um fenômeno que garante às plantas proteção contra a grande maioria dos micro-organismos fitopatogênicos; é a forma mais comum de resistência a doenças em plantas. Apesar de ter sido, ao longo dos anos, menos estudada e compreendida do que a resistência específica (mediada por genes *R*) apresenta-se como uma oportunidade promissora para a manipulação e transferência de determinantes de resistência tanto entre espécies cultivadas como

entre espécies selvagens. Técnicas moleculares que permitam a identificação de genes responsáveis pela resistência não-hospedeira em plantas, como a prospecção de genes e a seleção assistida por marcadores moleculares poderão auxiliar os programas de melhoramento, sendo também valiosas para elucidar os mecanismos moleculares da interação planta-patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cultura da Soja no Brasil

A soja é uma leguminosa de grande importância econômica. Seu centro de origem é o continente asiático, mais especificamente a região leste da China (HYMOWITZ & NEWELL, 1981), onde tem sido cultivada há mais de 3.000 anos (MORSE, 1950 *apud* LI *et al.*, 2008). Sua introdução no Brasil ocorreu no ano de 1882, no estado da Bahia e desde 2004 o país figura como o segundo maior produtor mundial, com produção recorde de 69,58 milhões de toneladas de grãos na safra 2009/10. É a cultura que recebe maior investimento em área plantada no país e um dos principais produtos nacionais de exportação (CONAB, 2010).

A soja tem sido utilizada há muito tempo como alimento, devido ao seu elevado teor proteico – é uma das maiores fontes de proteína vegetal – e seu óleo é, atualmente, o mais consumido no mundo (COSTA, 1996). Além disso, possui em sua composição química compostos polifenólicos como os isoflavonoides, que apresentam atividade antioxidante (ESAKI *et al.*, 1998; SAHIDI *et al.*, 1992), antifúngica (NAIM *et al.*, 1974), anticancerígena (DENIS *et al.*, 1999 *apud* PARK *et al.*, 2001), e propriedades estrogênicas (MURPHY, 1982).

A soja é um componente importante da dieta de grande parte da população mundial; além da alimentação humana, é também utilizada para o preparo de ração animal e como produto industrial. Seus grãos podem ser processados, gerando inicialmente o óleo, o farelo e a farinha. O farelo é utilizado na composição das rações animais; a farinha é usada para a fabricação de pães, doces e na composição de algumas massas e produtos, como a carne de soja e salsichas. Outro subproduto da soja é o leite, que se apresenta como uma boa alternativa em substituição ao leite convencional para pessoas com sensibilidade à lactose. O óleo de soja, principal produto, é dividido em três tipos básicos: o óleo refinado comestível utilizado em margarinas, óleos de cozinha, maionese, temperos, gorduras vegetais e produtos farmacêuticos; o óleo refinado para fins não alimentares, empregado na fabricação de velas, sabões, tintas, plásticos, lubrificantes, desinfetantes, inseticidas e na produção de bicompostíveis; e a lecitina de soja, usada na fabricação de produtos químicos, cosméticos e têxteis, alguns alimentos e sorvetes (GÓES-FAVONI *et al.*, 2004).

2.2. Ferrugem Asiática da Soja: Perdas Econômicas e Métodos de Controle

Embora o Brasil tenha incrementado a produção e a produtividade da cultura da soja nos últimos anos, diversos fatores bióticos e abióticos vêm acarretando prejuízos econômicos decorrentes da perda de grãos. Aproximadamente cinquenta doenças já foram identificadas no Brasil, sendo causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (YORINORI, 2002), sendo que atualmente, a doença que vem causando maiores perdas de produção é a ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. A FAS foi relatada pela primeira vez no Brasil no final da safra de 2000/2001, no estado do Paraná (YORINORI *et al.*, 2004), e desde então ocupa o topo na posição das doenças de maior importância para a cultura da soja. Hoje, praticamente todas as áreas produtoras de soja no país possuem focos da doença, que é responsável por perdas de rendimento de até 70% (SOARES *et al.*, 2004). Os prejuízos dispararam a partir de 2002, indicando que o custo da doença, em valor acumulado até a safra de 2008/2009, já ultrapassa US\$ 13 bilhões (DEL PONTE *et al.*, 2009). De acordo com levantamento da Embrapa, o prejuízo causado pela ferrugem na safra brasileira de 2008/2009 foi de US\$ 571,8 milhões (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2010).

A aplicação de fungicidas é um método necessário para o controle da ferrugem, mas aumenta substancialmente os custos de produção e constitui uma contínua fonte de contaminação ambiental. Uma estratégia no manejo da ferrugem asiática, objetivando reduzir a quantidade de uredósporos no ambiente na entressafra, é o “vazio sanitário”, período de proibição de soja no campo (SEIXAS & GODOY, 2007). O uso de cultivares resistentes parece ser o método mais promissor para o controle da doença. Até o momento, cinco genes de resistência foram relatados e vários outros foram identificados, e estão sendo incorporados em cultivares elites em vários programas de melhoramento no Brasil (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; MCLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA *et al.*, 2008, LAPERUTA *et al.*, 2008). No entanto, não se espera que a durabilidade da resistência em tais cultivares seja alta, haja vista a grande variabilidade do fungo e o fato de que todos esses genes de resistência já

tiveram sua resistência “quebrada” por pelo menos um isolado no mundo (YAMAOKA *et al.*, 2002).

2.3. Os Fungos de Ferrugem

Os fungos que causam ferrugem (Filo Basidiomycota, Classe Pucciniomycetes, Ordem Pucciniales) têm um ciclo de vida complexo, no qual podem estar presentes até cinco estágios de esporos, alguns dos quais, dependendo da espécie, precisam obrigatoriamente de duas espécies hospedeiras diferentes (ferrugens heteroécias); outros podem passar todo o seu ciclo de vida em uma única espécie (ferrugens autoécias) (LITTLEFIELD & HEATH, 1979). São parasitas obrigatórios, capazes de infectar um grande número de plantas vasculares, cultivadas ou silvestres. Determinadas famílias botânicas, como Polypodiaceae, Malpighiaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Pinaceae, Gramineae e Asteraceae são, particularmente, ricas em hospedeiros para numerosos gêneros e espécies de ferrugens (CUMMINGS, 1959; CUMMINGS, 1978).

Várias espécies consideradas como de distribuição mundial infectam plantas cultivadas, causando prejuízos significativos à agricultura. A literatura cita mais de 150 espécies de ferrugens como importantes ou potencialmente importantes para a agricultura na América do Sul. Como exemplos podem ser citadas as espécies que causam ferrugem: na soja (*Phakopsora pachyrhizi*), no café (*Hemileia vastarix* Berk. & Broome), feijão (*Uromyces appendiculatus* F. Strauss), cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd.), pimenta e pimentão (*Puccinia pampeana* Speg.), trigo (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Erikss. & Henning), plantas florestais e fruteiras mirtáceas (*Puccinia psidii* G. Winter), etc.

O fungo *Uromyces appendiculatus* (sin. *U. phaseoli* G. Winter), agente etiológico da ferrugem do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), está mundialmente distribuído. Contudo, a doença é favorecida nas regiões com temperaturas entre 17 e 27°C e umidade relativa do ar em torno de 95%, o que acarreta maiores perdas em regiões tropicais e subtropicais úmidas (McMILLAN *et al.*, 2003). Este é o caso do Brasil, onde *U. appendiculatus* representa um dos patógenos mais importantes do feijoeiro pelos sérios prejuízos que tem ocasionado (SOUZA *et al.*, 2007)

2.4. O Processo de Penetração Fúngica no Tecido Vegetal

O início da penetração dos fungos de ferrugem no tecido vegetal envolve um processo sensorial notável: depois da germinação dos uredósporos na superfície da planta, os tubos germinativos encontram os estômatos, sobre os quais formam apressórios. Uma vez ancorados, os apressórios lançam uma hifa de infecção, que penetra na abertura estomatal. A maioria dos fungos causadores de ferrugem não é capaz de penetrar diretamente nas células epidérmicas, de maneira que seu sucesso depende da capacidade de formar apressórios especificamente sobre os estômatos, um evento que não é aleatório (WYNN, 1976). Um dos poucos fungos de ferrugem que têm como característica a penetração direta de uredósporos através da cutícula é o *P. pachyrhizi* (BONDE *et al.* 1976).

Wynn (1976) comprovou que os tubos germinativos de *U. appendiculatus* formam apressório em resposta a uma topografia física específica, e que os estômatos propiciam essa topografia na superfície da folha. Por sua vez, uredósporos de *P. pachyrhizi* germinam e formam apressório mesmo em substratos artificiais como membranas de diálise, confirmando que sinais derivados da planta não são necessários para esses passos do desenvolvimento. No entanto, o tamanho dos poros da membrana determina a frequência de formação de apressório, sugerindo um envolvimento maior de tigmodiferenciação do que de quimiodiferenciação (KOCH & HOPPE 1988).

Uma ferramenta muito valiosa no estudo de caracteres morfológicos em fungos de diferentes espécies é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A morfometria das estruturas é extremamente facilitada utilizando-se esta técnica, que permite maior segurança e precisão dos resultados. A MEV também tem sido utilizada para demonstração de estruturas fúngicas modificadas em decorrência dos diversos eventos que ocorrem durante a interação fungo-planta, além de ser uma ferramenta chave na classificação de fungos da ordem Pucciniales. As imagens de paráfises, urediniósporos, teliósporos e outras estruturas geradas são de grande importância para a correta taxonomia destes fungos, assim como para a investigação da interação entre os causadores de ferrugem com plantas (MAY-DE MIO, 2006).

2.5. Bases Genéticas da Resistência

Uma das maneiras de classificar a resistência genética de plantas a fitopatógenos é considerar o número de genes envolvidos; existem exemplos onde a presença de um único gene é suficiente para conferir resistência (resistência monogênica), e exemplos onde são necessários vários genes (resistência poligênica). Tal classificação não sugere, no entanto, que monogenes e poligenes se enquadrem em duas categorias diferentes, com características fisiológicas distintas (CAMARGO, 1995). Fala-se em resistência monogênica, quando o efeito de um gene pode ser isolado de outras fontes de variação: o termo “*gene maior*” (gene de efeito principal) é empregado na literatura com relação a esse fenômeno. Já os “genes menores” (genes de efeito secundário - múltiplos “loci” polimórficos) são genes cujos efeitos não são grandes o suficiente para que possam ser isolados. Assim, quando a resistência for resultado do efeito de um conjunto de genes de efeito secundário, fala-se em resistência poligênica, ou quantitativa (FALCONER, 1989). De modo geral, são observados esses dois tipos de resistência, que aparecem na literatura com algumas expressões sinônimas: a resistência monogênica, controlada por genes R, também é chamada de específica, vertical ou qualitativa. A resistência poligênica recebe as denominações não específica, parcial, horizontal ou quantitativa (AGRIOS, 2005).

A resistência a doenças em plantas é frequentemente controlada por genes que conferem altos níveis de resistência, mas somente a genótipos específicos do patógeno (HULBERT *et al.*, 2001). Algumas variedades de planta são completamente resistentes a algumas raças do patógeno, ao mesmo tempo em que são suscetíveis a outras raças do mesmo. A resistência vertical é dita, portanto, raça-específica e é governada pelos genes R (AGRIOS, 2005). Estudos de análise genética da resistência em diversas espécies hospedeiras e da virulência específica nos patógenos correspondentes levaram à aceitação da hipótese gene-a-gene, proposta por Flor (1971): para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a virulência. Dessa forma, proteínas R específicas interagem com proteínas específicas de avirulência (*Avr*) do patógeno para causar resistência. Nos modelos mais simples, produtos de genes R de alguma forma reconhecem o produto gênico *Avr* do patógeno, seja pela interação direta com seu produto protéico, ou com algo

produzido pelo produto do gene *Avr*, no caso deste desempenhar um papel catalítico (STASKAWICZ *et al.*, 1995). Os genes *Avr* são assim chamados, portanto, porque causam avirulência na presença de genes *R* (BENT & MACKEY, 2007).

A maioria das proteínas *Avr* é considerada fatores de virulência requeridos para a colonização de plantas hospedeiras que, quando reconhecidos por cultivares resistentes, atuam como elicitores específicos da defesa da planta (ABRAMOVITCH & MARTIN, 2004). Elicitores são, portanto, moléculas codificadas direta ou indiretamente pelos genes *Avr* que, uma vez reconhecidas, desencadeiam respostas de defesa caracterizadas normalmente por uma Resposta de Hipersensibilidade (HR), que envolve a morte das primeiras células infectadas e o acúmulo local de compostos antimicrobianos (HULBERT *et al.*, 2001). As proteínas codificadas pelos genes de resistência melhor caracterizados carregam domínios encontrados também em outras proteínas receptoras e de transdução de sinal. O maior grupo de genes *R* contém repetições ricas em leucina (“Leucine Rich Repeats” – LRRs) e domínios de ligação a nucleotídeos (“Nucleotide Binding Sites” – NBS). A classe NBS-LRR pode ser subdividida com base em deduções acerca de características de sua estrutura N-terminal: muitas possuem um domínio que apresenta homologia com receptores de sinalização intracelular “Toll”, de *Drosophila*, e Interleukin-1 de mamíferos (TIR-NBS-LRR), enquanto outros contêm prováveis domínios “coiled coil” (CC-NBS-LRR). A classe CC-NBS-LRR provavelmente compreende múltiplas subfamílias que variam em tamanho e localização do domínio CC.

Entre as principais respostas de defesa desencadeadas por genes *R* estão: liberação de radicais livres, resposta de hipersensibilidade, reforço da parede celular por lignificação e produção de calose, produção de compostos antimicrobianos (fitoalexinas e enzimas hidrolíticas) e indução de proteínas relacionadas à patogênese (“Pathogenesis Related” ou PR) (STASKAWICZ *et al.*, 1995; KNOGGE, 1996).

Estudos de diversos patossistemas envolvendo patógenos intracelulares obrigatórios (vírus e micoplasmas) e intercelulares obrigatórios ou facultativos (bactérias, fungos e nematoides) forneceram evidências de que existem mecanismos comuns (ou muito similares) de reconhecimento e transdução de sinais em diferentes vias de sinalização gene-a-gene quando ocorre HR (KEEN, 1990; GABRIEL & ROLFE, 1990). As características fisiológicas comuns de HR compreendem: rápida explosão oxidativa, fluxo iônico caracterizado por trocas K^+ e

H⁺, descompartimentalização celular, reforço da parede celular, produção de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) e indução de proteínas PR (“Pathogenesis Related”) (STASKAWICZ *et al.*, 1995). Existe a hipótese de que a HR desencadeia uma resposta subsequente, referida como resistência sistêmica adquirida (SAR, do inglês “Systemic Acquired Resistance”), que reduz a severidade de doenças causadas por todas as classes de patógenos (RYALS *et al.*, 1994 *apud* STASKAWICZ *et al.*, 1995)

Heath, em 1980, propôs que a HR desempenha um papel na resistência a doenças. Em interações com patógenos biotróficos, a morte celular abstrém o patógeno de acesso a nutrientes. Em interações com patógenos necrotróficos, capazes de obter nutrientes de células mortas de plantas, acredita-se que o papel da HR é importante porque a consequente descompartimentalização celular leva à liberação de substâncias antimicrobianas armazenadas nos vacúolos (OSBOURN, 1996). Dois processos principais parecem resultar na morte celular na HR: a produção de espécies reativas de oxigênio (“Reactive Oxygen Species” – ROS) e a ativação de um processo de morte celular programada (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

2.6. Tipos de Resistência a Patógenos em Plantas

A coevolução ocorre quando uma interação entre dois ou mais organismos produz uma resposta evolutiva em cada um deles. De acordo com esta hipótese, proposta por Ehrlich & Raven (1964), parasitas e hospedeiros encontram-se em uma guerra evolutiva constante: qualquer modificação genética que represente um mecanismo de defesa inédito em determinada linhagem do hospedeiro é seguida pela evolução de um mecanismo complementar de ataque em uma linhagem do parasita, ou vice-versa. Esta guerra evolutiva tem um papel muito importante para a agricultura, uma vez que o homem estará sempre buscando variedades de plantas resistentes devido à plasticidade do patógeno (CAMARGO, 1995).

De um modo geral, os genes *R* têm sido empregados em larga escala na agricultura, mas perdem sua efetividade em pouco tempo, não conferindo dessa forma uma resistência duradoura, devido a mudanças na população do patógeno, que acaba tornando-se virulenta para as cultivares que carregam o gene (HULBERT *et al.* 2001). Presumindo que microrganismos patogênicos tenham sofrido co-

evolução com espécies de plantas, é esperado que algumas delas ainda estejam passando pelo processo de perda/aquisição da posição de hospedeiras de certa espécie de microrganismo (NIKS & MARCEL, 2009), posicionando-se intermediariamente entre hospedeira e não-hospedeira, como demonstraram Atienza *et al.* (2004) em um estudo da interação de cevada com o fungo de ferrugem, *Puccinia hordei*.

Bent & Mackey, (2007) descrevem um importante modelo evolucionário de quatro partes para a resistência a doenças em plantas: primeiramente, as plantas apresentam, além de barreiras químicas e físicas pré-formadas, um sistema imune capaz de detectar componentes genéricos conservados da maioria dos microrganismos. Na segunda parte do modelo, certos microrganismos se tornam patógenos adaptados a certas espécies de plantas pela evolução de fatores de virulência que suprimem partes das respostas gerais de defesa nesses hospedeiros. A terceira parte diz respeito à evolução nos hospedeiros, dos genes *R*, cujos produtos detectam direta ou indiretamente os fatores de virulência, visualizando seus efeitos em proteínas específicas do hospedeiro. Finalmente, o patógeno evolui ainda mais e consegue escapar da detecção pelos produtos dos genes *R*: para isso ele elimina os fatores de virulência detectáveis ou suprime as defesas induzidas no hospedeiro.

Ao contrário dos mamíferos, as plantas carecem de células defensoras dotadas de mobilidade e também de um sistema imune somático adaptativo. Ao invés disso, seu sistema imune é baseado na imunidade inata de cada célula e nos sinais provenientes dos sítios de infecção. A imunidade inata específica *R*-mediada está em sobreposição com uma ou mais vias de defesa basal. Defesas basais impedem a disseminação do patógeno no caso de uma infecção bem-sucedida e início da doença (DANGL & JONES, 2001). A sobreposição genética das respostas de defesa basal e específica sugere que a função da sinalização *R*-mediada é ativar de maneira mais rápida e eficiente os mecanismos de defesa que são compartilhados por ambas as vias (GLAZEBROOK *et al.*, 1997; YANG & KLESSIG, 1997; MCDOWELL & DANGL, 2000 *apud* DANGL & JONES, 2001).

Existe o reconhecimento, por parte do sistema imune basal, de uma série de moléculas conservadas em uma ampla gama de patógenos. O termo PAMP (“pathogen-associated molecular pattern”) para padrões moleculares associados ao patógeno foi cunhado por pesquisadores do sistema imunológico de mamíferos para

descrever esse tipo de componente de ativação da defesa. No entanto, o termo MAMP (“microbe-associated molecular pattern”), referente a padrões moleculares associados a micro-organismos parece ser mais adequado, uma vez que microrganismos não patogênicos também possuem PAMPs. Características comuns incluem a família de receptores extracelulares com domínios ricos em repetições de leucina que reconhece componentes conservados da superfície de micro-organismos. Exemplos de MAMPs detectados por plantas incluem flagelinas bacterianas, lipopolissacarídeos, quitinas fúngicas e heptaglicosídeos de oomicetos (JONES & TAKEMOTO, 2004; BENT & MACKEY, 2007).

As respostas imunes das plantas têm início com o reconhecimento de estruturas “non-self”. A atual compreensão do sistema imune das plantas é baseada em duas formas de imunidade inata, que envolvem classes diferentes de receptores; esses receptores permitem o reconhecimento de moléculas que podem ser conservadas entre membros de uma espécie de micro-organismos ou específicas de raças individuais de uma espécie microbiana.

Sob a ótica fisiológica, a resistência do hospedeiro ao ataque de um micro-organismo patogênico pode ser entendida como a capacidade da planta de atrasar ou até mesmo evitar a entrada ou subsequente atividade do micro-organismo em seus tecidos (GOODMAN *et al.*, 1986). O sistema de defesa vegetal é multicomponente e compreende mecanismos estruturais e bioquímicos, constitutivos (pré-formados) ou induzidos pela penetração do patógeno, que atuam de maneira dinâmica e coordenada (ISAAC, 1992; PASCHOLATI & LEITE, 1995). Essa atuação inicia-se com o reconhecimento, pelo hospedeiro, de sinais exógenos provenientes do patógeno, continua com a transdução desses sinais e resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (SOMSSICH & HAHLBROCK, 1998).

A evolução da resposta imune de plantas deu origem a um sistema altamente complexo, capaz de resistir ao ataque de patógenos. Quando um microrganismo consegue suplantiar as barreiras físicas e químicas da planta, depara-se com respostas induzidas do sistema imune. O sistema basal de defesa é o primeiro a ser ativado na interação micro-organismo-planta e se constitui de respostas de defesas gerais e localizadas. Existe ainda a outra linha de defesa, específica para cada tipo de patógeno, que gera respostas sistêmicas e duradouras mediadas por genes *R*.

2.6.1. Defesas pré-formadas

As barreiras pré-formadas são o primeiro obstáculo que um patógeno encontra ao tentar invadir a planta. O citoesqueleto fornece uma barreira física contra a maioria dos micro-organismos invasores, e os microfilamentos de actina desempenham um papel importante na defesa contra penetração fúngica (MYSORE & RYU, 2004). Yun *et al.* (2003) trataram diversas plantas não-hospedeiras (cevada, trigo, pepino e tabaco) com citocalasinas (inibidores específicos da polimerização da actina), e observaram que fungos não-hospedeiros foram capazes de penetrar nas células dessas plantas, comprovando o importante papel do citoesqueleto na resistência não-hospedeira.

A resistência imposta pela defesa pré-formada constitui a resistência básica passiva e é baseada nos aspectos morfológicos e também na produção constitutiva de compostos genericamente chamados antecipinas; as fitoantecipinas (VAN ETTEN *et al.*, 1994; OSBOURN, 1996) se contrapõem à formação de fitoalexinas – produzidas somente após o ataque pelo fungo. Fitoantecipinas podem ser produzidas na forma de compostos biologicamente ativos ou inativos, estes últimos sendo produzidos quando a integridade dos tecidos da planta hospedeira é comprometida (LEITE & STANGARLIN, 2008).

As saponinas são o exemplo mais comum de compostos ativos; elas existem em concentrações altas nos tecidos e foram apontadas como fundamentais para a defesa durante o ataque por fungos (OSBOURN, 1996). Saponinas são triterpenoides glicosilados, esteroides e alcaloides derivados de esteroides; as triterpenoides são mais frequentes em dicotiledôneas, enquanto as esteroides são mais frequentes em monocotiledôneas, e seu efeito fungitóxico está no fato de se ligarem a esteróides de membranas e causar malformações (PRICE *et al.*, 1987). Nas plantas, as saponinas ficam armazenadas em vacúolos.

A cutícula, estrutura que recobre a superfície dos vegetais, também se apresenta como um componente de defesa pré-formada. Outras barreiras estruturais importantes são os tricomas e os estômatos. Existem evidências consideráveis de que sejam as barreiras pré-formadas o principal componente da resistência não-hospedeira (HEATH, 1997).

2.6.2. Mecanismos de defesa induzíveis e componentes de sinalização

A infecção de plantas por fitopatógenos frequentemente conduz a uma resposta de defesa da planta por meio de mecanismos de eficiência variável (PASCHOLATI & LEITE, 1995); os mecanismos de defesa induzíveis são o segundo obstáculo enfrentado por microrganismos invasores. Um dos mecanismos mais eficientes é a HR, em que há a indução de fitoalexinas e várias proteínas.

As fitoalexinas constituem um grupo de metabólitos secundários de natureza química diversa e baixa massa molecular, produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos; acumulam-se em concentrações tóxicas aos patógenos, em torno do local de infecção, apresentando atividade antimicrobiana. O modo de ação das fitoalexinas sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas – efeitos que refletem na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (LO *et al.*, 1996). Diversos mutantes deficientes para a produção de fitoalexina (*pad* – “phytoalexin-deficient”) foram identificados em *Arabidopsis* (GLAZEBROOK *et al.*, 1997), e um deles, o *pad3-1* tem sua resistência não-hospedeira a *Alternaria brassicicola* comprometida (THOMMA *et al.*, 1999). O gene *pad3* codifica para uma provável citocromo P450 mono-oxigenase, requerida para a biossíntese de camalexina (uma fitoalexina indol) (ZHOU *et al.*, 1999).

As proteínas induzidas por HR incluem: proteínas estruturais, incorporadas à matriz extracelular na tentativa de confinamento do patógeno – glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e glicina, e enzimas peroxidase envolvidas na lignificação; enzimas do metabolismo secundário, como as envolvidas na síntese de antibióticos; e proteínas relacionadas à patogênese (PR).

No caso de um patógeno conseguir superar os mecanismos de defesa induzidos, ele deve ainda vencer diversos componentes de sinalização para causar doenças nas plantas. Como exemplos existem o hormônio etileno (ET), o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (JA), que desencadeiam rotas de sinalização específicas e coordenam as respostas de defesa ao ataque patogênico (MYSORE & RYU, 2004).

2.7. Resistência Não-Hospedeira

Cada espécie de planta é hospedeira para um pequeno e diferente conjunto de microrganismos patogênicos, que constituem uma proporção mínima do número total de patógenos de planta conhecidos (AGRIOS, 2005), o que demonstra que na natureza resistência é regra, ao passo que suscetibilidade é exceção (PASCHOLATI & LEITE, 1995). A forma mais comum e durável de resistência é a Resistência Não-Hospedeira (Resistência NH), que é apresentada por todos os indivíduos de uma espécie de planta a todas as variantes genéticas de determinado patógeno (HEATH, 2000).

A resistência não-hospedeira a patógenos não adaptados é resultado de inúmeras estratégias de defesa – respostas gerais e altamente especializadas, que funcionam para prevenir as doenças causadas pela maioria dos patógenos microbianos que elas encontram (HEATH, 1997). Tais defesas incluem componentes antimicrobianos constitutivos e induzíveis que impedem a diferenciação do patógeno no tecido vegetal, reforços na parede celular, para prevenir sua entrada e morte celular programada, para limitar seu estabelecimento e disseminação (ABRAMOVITCH & MARTIN, 2004). Muitas respostas de defesa induzíveis estão envolvidas em ambas, resistência hospedeira e não-hospedeira, sugerindo que elas podem ser elicitadas por sinais parasita-específicos ou não específicos (HEATH, 2000).

As barreiras pré-formadas parecem contribuir mais para a resistência a patógenos de outras famílias de plantas do que para patógenos de espécies relacionadas. Os componentes induzíveis da resistência não-hospedeira parecem ser o fenômeno mais comum quando o não-hospedeiro é relacionado com a espécie hospedeira para o microrganismo (NIKS & MARCEL, 2009). Quando um patógeno heterólogo (patógeno de planta não-hospedeira) consegue superar as barreiras constitutivas, ele pode estar sujeito ao reconhecimento na membrana plasmática das células da planta. Diversos MAMPs, são capazes de mediar respostas de defesa em plantas não-hospedeiras (NÜRNBERGER & LIPKA, 2005). Uma variedade de produtos fúngicos podem ser elicitores de respostas de defesa da planta em ambas, resistência hospedeira e não-hospedeira. Tais respostas também podem ser desencadeadas por produtos liberados durante a degradação da parede celular (HEATH, 2000).

2.7.1. Tipos de resistência não-hospedeira

Diversas cascatas de sinalização de defesa são ativadas quando ocorre uma interação incompatível entre uma planta não-hospedeira e um patógeno, tais como geração de ROS, morte celular programada ou HR em células infectadas e indução de genes relacionados à patogenicidade (PR). As respostas de hipersensibilidade (HR) são usadas como marcadores visuais dessas interações incompatíveis, mas nem sempre são induzidas durante respostas de defesa não-hospedeira. Sendo assim, MYSORE & RYU (2004) propuseram a classificação da resistência não-hospedeira contra bactérias, fungos e oomicetos em dois tipos: I e II. A resistência não-hospedeira do tipo I não produz nenhum sintoma visível (necrose), e a tipo II está sempre associada à rápida formação de necrose localizada (HR). O tipo de resistência não-hospedeira exibida vai depender tanto da espécie da planta quanto do patógeno, de modo que uma planta pode apresentar resistência do tipo I contra uma determinada espécie de patógeno e resistência tipo II contra outra espécie. Da mesma forma, um mesmo patógeno pode desencadear resistência do tipo I ou II dependendo da espécie de planta.

Resistência Tipo I

A resistência assintomática (sem HR) é provavelmente o tipo mais comum de resistência, e, no entanto, tem recebido pouca atenção nos últimos anos. Existem poucos casos descritos de resistência gene-a-gene não mediada por HR, como, por exemplo, o mutante *dnd1* (“defense no death”) de *Arabidopsis*, que confere resistência contra bactérias virulentas sem HR (YU *et al.*, 1998). Com base no fato de que nem sempre a HR é requerida para a resistência a doenças, MYSORE & RYU (2004) propuseram um mecanismo de resistência não-hospedeira do tipo I (Figura 1a).

Logo que o patógeno chega à superfície da planta e tenta penetrar no tecido hospedeiro em busca de nutrientes, deve encarar as barreiras pré-formadas – paredes celulares, componentes microbianos e outros metabólitos secundários. O segundo obstáculo são as respostas de defesa induzíveis: conforme citado anteriormente, a planta reconhece elicitores gerais do patógeno e MAMPs, responsáveis pela ativação de respostas de defesa e indução da imunidade inata, respectivamente (NÜRNBERGER & BRUNNER, 2002). Algumas das respostas da

planta a esse ataque são: engrossamento da parede celular, lignificação da parede celular, acúmulo de compostos fenólicos, produção de saponinas e fitoalexinas, formação de papilas e indução de genes *PR* (HEATH, 1997; DIXON, 2001).

Ainda que não apareçam sintomas visíveis, diversas mudanças moleculares podem estar ocorrendo. Por exemplo, num estudo de interação não-hospedeira entre *A. thaliana* e a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, verificou-se, além da expressão de genes *PR*, uma grande quantidade de genes de defesa similares àqueles ativados durante a resistência gene-a-gene também foram expressos (TAO *et al.*, 2003).

Resistência Tipo II

O fenômeno mais discutido e estudado de resistência não-hospedeira é aquele no qual existe uma resposta de hipersensibilidade. A chamada resistência Tipo II é fenotipicamente semelhante a uma interação gene-a-gene incompatível, e acontece quando o patógeno consegue passar pelas primeiras camadas de defesa da planta produzindo enzimas desintoxicantes que superam os eventuais efeitos tóxicos dos metabólitos secundários pré-formados. O obstáculo seguinte enfrentado pelo patógeno é o mecanismo de vigilância celular: a planta reconhece elicitores do patógeno e é capaz de desencadear mecanismos de defesa que conduzem à HR. O reconhecimento dos elicitores pode ocorrer na membrana plasmática ou no citoplasma da planta. Em fungos e oomicetos, proteínas extracelulares das hifas ou secretadas funcionam como elicitores, enquanto em bactérias existem as proteínas de avirulência. Quando tanto os mecanismos de defesa pré-formados quanto os induzidos por elicitores são superados, patógenos fúngicos e oomicetos conseguem penetrar diretamente na célula da planta; patógenos bacterianos injetam proteínas de virulência e avirulência (Figura 1b) (HUTCHESON, 2001).

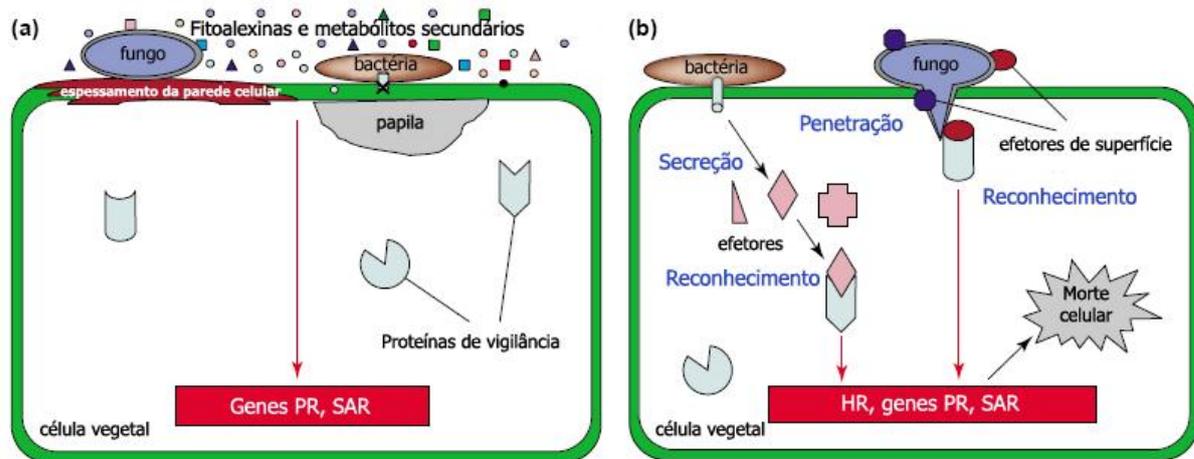


Figura 1: Modelo para a resistência não-hospedeira do tipo I e do tipo II. a) Na resistência tipo I, o patógeno heterólogo não consegue superar as respostas de defesa pré-formadas e induzidas. A expressão de genes *PR* como componente da SAR pode ser induzida por elicitores gerais do patógeno heterólogo. b) Durante a resistência tipo II, o patógeno heterólogo consegue superar barreiras pré-formadas induzidas. Elictores específicos do patógeno são então reconhecidos pelo sistema de vigilância da planta, e isso desencadeia respostas de defesa que culminam com HR. A indução de genes *PR* e a SAR também são obtidas durante a resistência tipo II. Modificado de MYSORE & RYU, 2004.

2.7.2. Genes de resistência não-hospedeira

A planta modelo *A. thaliana* tem se tornado, ao longo das últimas décadas, um organismo valioso para o estudo da resistência não-hospedeira em plantas (HOLUB & COOPER, 2004). Diversos estudos envolvendo principalmente mutantes de *A. thaliana* conduziram à identificação de genes envolvidos em respostas de defesa na resistência não-hospedeira; alguns desses genes, relacionados à resistência contra o fungo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*), causador do oídio em cevada, levaram à hipótese da resistência não-hospedeira em multicamadas, com a parede celular da planta sendo a primeira linha de defesa, e a morte celular a segunda (ZELLERHOFF *et al.*, 2010). Em plantas selvagens de *A. thaliana*, patógenos heterólogos são neutralizados no estágio pré-invasivo da penetração, resistência que é associada à formação de aposições da parede celular ricas em calose (papilas), materiais como lignina e peróxido de hidrogênio. Quando essa primeira camada de defesa é violada, o crescimento do patógeno é freado por meio de HR das células atacadas, que leva à morte celular (SCHWEIZER, 2007).

Progressos notáveis no entendimento da resistência NH surgiram do estudo de mutantes de penetração (*pen1*, *pen2* e *pen3*), também em *A. thaliana*. Para cada

um desses mutantes, as taxas de penetração de fungos heterólogos de oídio em células epidermais são muito mais elevadas. PEN1 codifica uma sintaxina que pode desempenhar um papel no tráfego de vesículas para a membrana plasmática (COLLINS *et al.*, 2003 *apud* MYSORE & RYU, 2004). PEN2 é uma glicosil-hidrolase, enquanto PEN3 é um transportador ABC que parece atuar em cooperação com PEN2 (LIPKA *et al.*, 2005; STEIN *et al.*, 2006).

A cevada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) tem sido relatada como não-hospedeira para os fungos *B. graminis* f. sp. *tritici*, causador do oídio em trigo, *Puccinia triticina*, causador da ferrugem do trigo e ao isolado CD180 do gênero *Magnaporthe*, que é associado com espécies hospedeiras de *Pennisetum* (ZELLERHOFF *et al.*, 2006). Nos três patossistemas, a incompatibilidade parece ser baseada principalmente na primeira camada de defesa.

2.8. Similaridades entre Resistências Gene-a-Gene e Não-Hospedeira

Muitas das respostas de defesa induzidas durante a resistência não-hospedeira são similares às de resistência hospedeira gene-a-gene, tais como a indução de HR, a produção de ROS e o engrossamento da parede celular por deposição de lignina. Mesmo que ambos os tipos de resistência compartilhem repostas de defesa similares, ainda não é certo se estas envolvem as mesmas rotas de transdução de sinais (MYSORE & RYU, 2004). Uma evidência importante de que as rotas de transdução de sinais na resistência não-hospedeira podem convergir com rotas da resistência R é a demonstração de que a proteína SGT1 é necessária tanto para a resistência hospedeira quanto não-hospedeira, em plantas (PEART, 2002). O silenciamento do gene *sgt1* comprometeu diversos tipos de resistência em *Nicotiana benthamiana*, embora nem todos os exemplos de resistência não-hospedeira tenham sido prejudicados nas plantas de *N. benthamiana* silenciadas.

Outras evidências surgiram dos mutantes de *Arabidopsis nho1* e *eds1*. A mutação em *nho1* compromete não apenas a resistência não-hospedeira a *P. syringae* pv. *phaseolicola* e *Botrytis cinerea*, mas também a resistência gene-a-gene mediada por *rps2*, *rps4*, *rps5* e *rpm1* (LU *et al.*, 2001). Os mutantes *eds1* apresentam a resistência mediada por genes R comprometida para diversos patógenos, e inclusive sua resistência não-hospedeira contra isolados de

Perenospora parasitica e *Albugo candida* (PARKER *et al.*, 1996; AARTS *et al.*, 1998).

A resistência não-hospedeira induzida por MAMPs e a resistência cultivar-específica Avr-induzida deveriam ser consideradas coletivamente como elementos complementares da imunidade inata da planta, moldados durante a coevolução com patógenos microbianos (ESPINOSA & ALFANO, 2004; NÜRNBERGER *et al.*, 2004).

A resistência não-hospedeira possui importância prática porque, com o suporte dado pelas modernas técnicas de biotecnologia, os melhoristas são potencialmente capazes de transferi-la de uma cultura para a outra, ou até mesmo de uma espécie selvagem para uma cultura. Esta possibilidade se torna particularmente atraente quando considerada juntamente com plantas modelo, tais como *Arabidopsis* – que exibe resistência não-hospedeira à grande maioria dos fitopatógenos de culturas de interesse econômico (HOLUB & COOPER, 2004).

2.9. Genômica Funcional

A Genômica Funcional compreende a descrição da função específica de genes e proteínas, relacionando etapas de fluxo de informação biológica e relacionando a regulação da expressão gênica com mecanismos bioquímicos e fisiológicos. A transcriptômica estuda o conjunto completo de RNA mensageiro (RNAm) transcrito em determinado organismo, sob determinada condição (ambiental ou temporal). O estudo do transcriptoma de uma célula ou tecido representa o primeiro passo na caracterização funcional de genes de interesse. Várias estratégias metodológicas foram criadas para abordar a transcriptômica, e elas não implicam, necessariamente, no sequenciamento de transcritos em larga escala. As metodologias utilizadas para estabelecer perfis transcricionais geralmente baseiam-se na geração de populações de DNA complementar (cDNA) a partir da população de RNAm expressa. O estudo de RNAm tem se beneficiado muito com as tecnologias baseadas em Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), com o intenso sequenciamento de cDNA e síntese *de novo* de ácidos nucleicos.

O primeiro grupo de técnicas de análise de transcriptomas baseia-se nas várias formas de acessar a quantidade de um transcrito específico em uma dada amostra em um determinado momento, como a técnica de “Northern Blot” (ALWINE *et al.*, 1977). Um segundo grupo de técnicas se baseia na análise global de

transcritos, como é possível através da Análise Serial da Expressão Gênica (“Serial Analysis of Gene Expression” ou SAGE - VELCULESCU *et al.*, 1995) e suas variações, como SuperSage (MATSURA *et al.*, 2005) e de técnicas de sequenciamento massal de transcritos (WEBER *et al.*, 2007). Um terceiro grupo de técnicas, denominado genômica comparativa, tem como destaques técnicas como “Differential Display” (LIANG & PARDEE, 1992), “RNA fingerprinting” (WELSH *et al.*, 1992), cDNA-AFLP (BACHEM *et al.*, 1996), Hibridização Subtrativa (DIATCHENKO *et al.*, 1996) e Microarranjos de DNA (SCHENA *et al.*, 1995). Tais técnicas permitem isolar transcritos que sejam expressos em um dado tecido, fase do desenvolvimento ou condição, como, por exemplo, uma situação de doença sistêmica na planta, utilizando uma amostra controle como referência para comparação.

2.9.1. Hibridização Subtrativa Supressiva

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de detalhar a expressão e identificar genes expressos em plantas sob diversos tipos de estresse. Análises de transcriptoma com a técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) têm sido feitas com sucesso em várias espécies para isolar genes envolvidos em respostas a estresses bióticos e abióticos (ZHANG *et al.*, 2005; VENKATACHALAM *et al.*, 2007). A hibridização subtrativa consiste num método de análise de expressão gênica capaz de enriquecer uma população de cDNAs com transcritos diferencialmente expressos. Para tanto, são usadas duas amostras de referência: uma que possui os transcritos de interesse (“tester”) e uma utilizada como controle (“driver”). A amostra “tester” é originária de um tecido exposto a alguma situação de estresse, que pode ser um ambiente inadequado ou a exposição a algum patógeno; o “driver” é proveniente de uma amostra submetida a condições normais.

A SSH é um método baseado em PCR, desenvolvido por Diatchenko *et al.* (1996) que supera algumas limitações das metodologias tradicionais de hibridização subtrativa, como a demanda de grandes quantidades iniciais de RNAm e a produção de uma pequena quantidade de cDNA ao final do processo, o que dificultava sua clonagem. A SSH resulta em um enriquecimento de até 1000 vezes na quantidade de transcritos diferencialmente expressos, sendo, portanto ideal para a identificação de transcritos raros (JI & CAI, 2004).

Na SSH, o cDNA da amostra testadora é subdividida em duas partes, sendo cada uma delas ligada a um adaptador diferente (a sequência deste adaptador é complementar aos iniciadores que serão utilizados posteriormente para amplificação por PCR). Duas hibridizações são então realizadas. Na primeira, um excesso de cDNA referência é adicionado a cada amostra do testador. As amostras são então desnaturadas por calor e deixadas para hibridizar, gerando as moléculas tipo 'a', 'b', 'c' e 'd' em cada amostra (Figura 2). As moléculas tipo 'a' são significativamente enriquecidas com sequências diferencialmente expressas, enquanto os cDNAs que não são diferencialmente expressos formam as moléculas tipo 'c' mediante complementação com o cDNA referência (DIATCHENKO *et al.*, 1996).

Na segunda hibridização, as duas amostras da primeira hibridização são misturadas sem serem desnaturadas. Agora, somente os cDNAs "tester" de fita única subtraídos e equalizados podem se reassociar, formando um novo tipo de híbridos: as moléculas tipo 'e' (Figura 2). Após essa segunda hibridização, as moléculas residuais das populações 1 e 2 contendo em sua extremidade 5' os chamados adaptadores 1 e 2R, respectivamente, têm suas extremidades 3' preenchidas através da utilização de DNA polimerase I na presença de dNTPs. Ao completar essas moléculas, estamos adicionando às suas extremidades 3' o segmento complementar aos adaptadores presente na molécula complementar. Estes novos híbridos serão amplificados por PCR, gerando a população de cDNAs enriquecida com sequências diferencialmente expressas. As moléculas tipo 'a' e 'd' não podem ser amplificadas, por não possuírem o sítio de complementação dos iniciadores (Figura 2). As moléculas tipo 'c' possuem somente um sítio de complementação de "primer", e são amplificadas linearmente.

A PCR é denominada supressiva porque os fragmentos de cDNA que têm o mesmo tipo de adaptador (moléculas tipo "b") em suas extremidades são excluídos do processo de amplificação ao formar uma estrutura em alça, devido ao pareamento intramolecular das regiões complementares relativamente extensas, correspondentes ao adaptador, em ambas as extremidades. Quando as moléculas têm em suas extremidades os adaptadores 1 e 2R, o trecho de complementaridade não é suficientemente longo para garantir a estabilidade dessa estrutura em alça. Para aumentar a eficiência do processo de amplificação das moléculas de cDNA diferencialmente expressas é feita uma segunda reação de PCR com oligonucleotídeos que pareiam mais internamente nas moléculas-moldes (chamada

“nested” PCR). A partir daqui as moléculas diferencialmente expressas amplificadas podem ser diretamente inseridas em um vetor de clonagem, o qual é adaptado para produtos de PCR, para a clonagem e obtenção de uma biblioteca subtrativa (DIATCHENKO *et al.*, 1996).

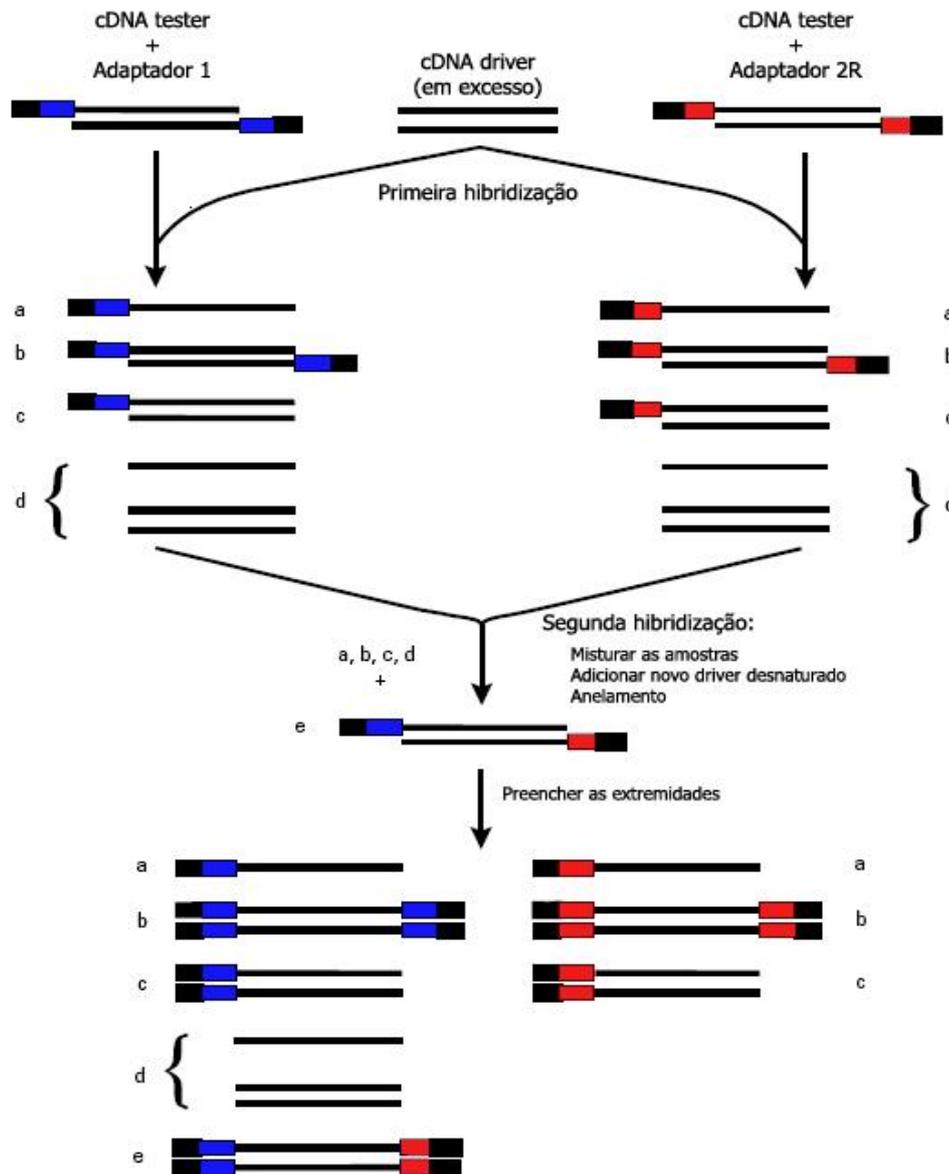


Figura 2: Esquema do processo de Hibridização Subtrativa.

2.10. RT-PCR quantitativo

A quantificação dos níveis de expressão de RNAs alvo se tornou uma etapa imprescindível de grande parte dos experimentos de genética molecular. Estimando a quantidade de RNA celular é possível saber a medida na qual determinado gene está sendo expresso (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008). O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) tornou-se o método padrão para a detecção e quantificação de alvos de RNA pois é uma ferramenta poderosa, especialmente em casos onde existe baixa abundância de transcritos, ou em tecidos com baixa concentração de RNA. É o método mais sensível para a detecção e quantificação dos níveis de expressão gênica (BUSTIN, 2000; PFAFFL, 2004), e em comparação com outras técnicas atualmente disponíveis, permite a detecção de um dado alvo de ácido nucleico de forma rápida, específica e muito sensível.

A técnica de qRT-PCR difere da PCR clássica porque são incorporados fluorocromos durante a polimerização dos novos produtos, e a fluorescência é detectada a cada ciclo. Durante a fase exponencial da corrida, a amplificação é acompanhada em tempo real, o que permite determinar as quantidades iniciais do gene alvo (GACHON *et al.*, 2004). A utilização dessas moléculas repórteres fluorescentes para monitorar a síntese dos produtos de amplificação torna real a capacidade quantitativa inerente aos ensaios baseados em PCR (BUSTIN, 2005). Os ensaios são caracterizados pelo ponto durante a ciclagem no qual a amplificação de um produto de PCR é primeiramente detectada (chamado C_T – “cycle threshold”); quanto maior a quantidade de amostra inicial, mais cedo vai acontecer o aumento significativo na fluorescência responsável pela detecção.

Existem diversas técnicas que permitem o monitoramento do progresso da PCR, sempre baseadas em algum tipo de molécula marcadora fluorescente, que se liga ao DNA. Um dos métodos mais populares faz uso de moléculas fluorescentes intercalantes denominadas “dyes”, como o SYBR Green[®]. Em solução, o “dye” não ligado ao DNA exibe baixa fluorescência; durante a PCR, grandes quantidades de “dyes” ligam-se aos DNAs fita dupla recém-sintetizados. Quando monitorados em tempo real, isso resulta no aumento do sinal de fluorescência à medida que a polimerização ocorre. As vantagens desta técnica são seu baixo custo quando comparado com outros métodos, e também o fato de que na maioria das vezes, ensaios de RT-PCR convencionais podem ser convertidos imediatamente em

ensaios em tempo-real (BUSTIN, 2005). Sua desvantagem é que a especificidade permanece dependente da especificidade dos “primers”.

Os métodos de detecção baseados em sondas são mais específicos, e fazem uso de sondas complementares ao gene de interesse, marcadas com corantes fluorescentes. O tipo mais comumente utilizado é o sistema Taqman[®].

Os níveis de expressão gênica podem ser medidos de forma absoluta ou relativa. Quando é necessário saber o número absoluto de cópias de um transcrito alvo, a quantificação é feita com base em diluição seriadas de uma amostra padrão externa, usada para gerar uma curva de calibração (BUSTIN, 2000). As curvas de calibração são baseadas em concentrações conhecidas de moléculas padrão de DNA, por exemplo, DNA plasmidial recombinante (recDNA) e DNA genômico (PFAFFL, 2004).

A quantificação relativa a um padrão endógeno é obtida por meio da comparação dos valores de C_T do transcrito alvo com os de um ou mais genes de referência endógenos. Os resultados são expressos na forma de razões entre o sinal específico do alvo e da referência endógena, estratégia que atribui um valor relativo ao produto de RNA específico que permite a comparação entre amostras submetidas a diferentes condições (BUSTIN, 2005). Para tanto, é necessário que as eficiências de amplificação do alvo e do endógeno sejam similares, uma vez que isso influencia na acurácia do resultado do cálculo da expressão.

Independentemente da técnica experimental empregada, é imprescindível uma normalização apropriada para a obtenção de níveis precisos e confiáveis de expressão gênica. O propósito da normalização é corrigir a variabilidade associada aos diversos passos do procedimento experimental (HUGGET *et al.*, 2006 *apud* EXPOSITO-RODRIGUEZ *et al.*, 2008). O uso de controles endógenos ou genes de referência tornou-se o método de escolha, uma vez que as sequências alvo e os endógenos estão naturalmente presentes na mesma amostra biológica e conseqüentemente estarão sujeitos às mesmas variações ao longo do experimento (NOLAN *et al.*, 2006). O uso de genes “housekeeping” como controle endógeno é consenso, pois assume-se que são constitutivamente expressos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar através de parâmetros fenotípicos e moleculares, a resistência não-hospedeira da soja ao fungo *Uromyces appendiculatus* e compreender mecanismos moleculares de expressão e interação entre genes que estejam envolvidos neste patossistema, proporcionando estratégias para a obtenção de plantas de soja com resistência mais duradoura à ferrugem asiática da soja.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar, por Microscopia Eletrônica de Varredura, a ultraestrutura do fungo na superfície foliar;
- Construir bibliotecas subtrativas de cDNAs de soja durante a interação com o patógeno *Uromyces appendiculatus*, causador da ferrugem no feijoeiro;
- Identificar genes de soja diferencialmente expressos sob interação com *U. appendiculatus*;
- Comparar os transcritos diferencialmente expressos entre as bibliotecas construídas para diferentes tempos de interação;
- Quantificar o nível de expressão de alguns potenciais genes identificados como atuantes no mecanismo de resistência não-hospedeira.

4. REFERÊNCIAS

AARTS, N.; METZ, M.; HOLUB, E.; STASKAWICZ, B. J.; DANIELS, M. J.; PARKER, J. E. Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.95, p.10306-10311, 1998.

ABRAMOVITCH, R.B.; MARTIN, G.B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.7, p.356–364, 2004.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5^a ed. California: Academic Press, p.93-114, 2005.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, 74: 12: 5350-5354, 1977.

ATIENZA, S. G.; JAFARY AND, H.; NIKS, R. E. Accumulation of genes for susceptibility to rust fungi for which barley is nearly a nonhost results in two barley lines with extreme multiple susceptibility. **Planta**, v.220, p.71–79, 2004.

BACHEM, C.; VAN DER HOEVEN, R. S.; DE BRUIJN, S. M.; VREUQDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger-printing based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant Journal**, Oxford, 9: 5:745-753, 1996.

BENT. A. F.; MACKEY, D. Elicitors, Effectors, and *R* Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.45, p.399–436, 2007.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v.66, p.1290-1294, 1976.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254 - 255, 1980.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.**, v.29, p. 169-93, 2000.

BUSTIN, S.A. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. **Expert Rev Mol Diagn.**, v. 5, n. 4, p. 493-498, 2005.

CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de Variabilidade Genética de Agentes Fitopatogênicos. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.470-493, 1995.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos 2009-2010, quinto levantamento, fevereiro 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2010.

CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM. Monitorando a dispersão da ferrugem asiática da soja no Brasil. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net>>. Acesso em: junho 2010.

COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Ed. do autor, 1996. 233p.

CUMMINS, G.E. **Illustrated genera of rust fungi**. Minneapolis. Saint Paul: Burgess Publ. Co., 1959. 131p.

CUMMINS, G.E. **Rust Fungi on Legumes and Compositae in North America**. Tucson: Univ. Arizona Press, 1978. 424p.

DANGL, J. L., JONES JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v.411, p.826–833, 2001.

DEL PONTE, E.M.; SPOLTI, P.; GODOY, C.V. Ferrugem asiática da soja: panorama e perspectivas para o manejo. **Plantio Direto**, out-nov 2009, p.16-19, 2009.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating

differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** v.93, n.11, p.6025-6030, 1996.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843–847, 2001.

EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, v.18, p.586-608, 1964.

ESAKI, H.; ONOZAKI, H.; MORIMITSU, Y. Potent antioxidative isoflavones isolate from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62 (4), 740-746, 1998

ESPINOSA, A.; ALFANO, J. R. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity, **Cell Microbiol.**, v.6, p.1027-1040, 2004.

EXPOSITO-RODRIGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PEREZ, A.; PEREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 131, 2008.

FALCONER, D. S. Introduction to Quantitative Genetics, ed.3. Longmans Green/John Wiley & Sons, Harlow, Essex, UK/New York. 1989.

FLOR, H.H. Current status of gene-a-gene concept. **Annu Rev Phytopathol**, v.9, p.275-296, 1971.

GABRIEL, D. W., ROLFE, B. G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.28, p.365-91, 1990.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**. v. 55, n.402, p. 1445-1454, 2004.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.D.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance

genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theor Appl Gen**, v.117, p.545-553, 2008.

GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E. E.; AUSUBEL, F. M. Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. **Annu. Rev. Genet.**, v.31, p.547–569, 1997.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em Produtos Comerciais de Soja. **Ciência Tecnologia e Alimentos**. V.24, n.4, p.582-586, 2004.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. **The Biochemistry and Physiology of Plant Disease**. University of Missouri Press. 433p. 1986.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D.G. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. **The Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. 1135 - 1136, 1986.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 237 - 239, 1983.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Plant Biology**, v.3, p.315–319, 2000.

HEATH, M.C. Reaction of nonsusceptors to fungal pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.18, p.211-236, 1980.

HEATH, M.C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Ann Botany**, v.80, p.713-720, 1997.

HOLUB, E. B.; COOPER, A. Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. **Trends in Plant Science**, v.9 n.5, May 2004.

HULBERT, S.H.; WEBB, C.A.; SMITH, S.M. Resistance gene complexes: evolution and utilization. **Annu Rev Phytopathol**, v.39, p.285-312, 2001.

HUTCHESON, S.W. The molecular biology of hypersensitivity to plant pathogenic bacteria. **J. Plant Pathol.**, v.83, p.151–172, 2001.

HYMOWITZ, T., NEWELL, C.A. Taxonomy of genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. **Econ Bot**, v.35, p.272–288, 1981.

ISAAC, S. Fungal-plant Interactions. London, Chapman & Hall, 418p. 1992.

JI, W.; CAI, L. Suppression Subtractive Hybridization PCR. In: WEISSENSTEINER, T.; GRIFFIN, H. G.; GRIFFIN, A. (Ed.). PCR Technology: Current Innovations, 2: 287-298, 2004.

JONES, D.A., TAKEMOTO, D. Plant innate immunity—direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Curr. Opin. Immunol.**, v.16, p.48–62, 2004.

KEEN, N.T. Gene-for-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. **Annu Rev. Genet.**, v.24, p.447-63, 1990.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, 1711 1722, Oct. 1996.

KOCH, E.; HOPPE, H.H. Development of infection structures by direct-penetrating soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) on artificial membranes. **Journal of Phytopathology**, v.122, p.232-244, 1988.

LAPERUTA, L. di C.; ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; RACHID, B. F.; PIEROZZI, P. H. B.; TOLEDO, J. F. F de.; PÍPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. de S. New genes conferring resistance to Asian soybean rust: allelic testing for the Rpp2 and Rpp4 loci. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 12, p. 1741 - 1747, 2008.

LEITE, B.; STANGARLIN, J. R. Fisiologia e Bioquímica de Doenças Fúngicas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno – Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 115-152, 2008.

LI, Y. *et al.* Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China. **Theor Appl Genet**, v.117, p.857–871, 2008.

LIANG, P., PARDEE, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.

LIPKA, V.; DITTMER, J.; BEDNAREK, P.; BHAT, R.; WIEMER, M.; STEIN, M.; LANDTAG, J.; BRANDT, W.; ROSAHL, S.; SCHEEL, D.; LLORENTE, F.; MOLINA, A.; PARKER, J.; SOMERVILLE, S.; SCHULZE-LEFERT, P. Pre- and post-invasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. **Science**, v.301, p.1180-1183, 2005.

LITTLEFIELD, L. J.; HEATH, M. C. **Ultrastructure of Rust Fungi**. Academic Press: New York, 1979.

LO, S.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.1, p.21-31, 1996.

LU, M.; TANG, X.; ZHOU, J. M. Arabidopsis *NHO1* Is Required for General Resistance against *Pseudomonas* Bacteria. **Plant Cell**. v.13, p.437-447, 2001.

MATSUMURA, H.; ITO, A.; SAITOH, H.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D.H.; TERAUCHI, R.). Supersage. **Cellular Microbiology**. v. 7, p. 11-18, 2005.

MAY-DE MIO, L. L.; NOVAES, Q. S; ALVES E. Methodologies processed of some rusts fungi by scanning electron microscopy. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.3, p.267-273, 2006.

McLEAN, R. J.; BYTH, D. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 951 - 956, 1980.

McMILLAN, M. S.; SCHWARTZ, H. F.; OTTO, K. L. Sexual stage development of *Uromyces appendiculatus* and its potential use for disease resistance screening of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1133-1138, 2003.

MORCELI, T.G.S.; TREVISOLI, S.H.U.; MORCELI JUNIOR, A.A.; KIIHL, R.A.S.; CALVO, E.S.; DI MAURO, A.O.; GARCIA, A. Identificação e validação de marcadores microssatélites ligados ao gene *Rpp5* de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesq Agropec Bras**, v.43, n.11, p.1525-1531, 2008.

MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technol.** v.36, p.60–64, 1982.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Plant Science**, n.2, v.9, p.97-104, 2004.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. **J. Agric. Food Chem.** 22 (5), 806-810. 1974.

NIKS, R. E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? **New Phytologist**, v.182, p.817–828, 2009.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc.**,v.1, n.3, p. 1559-1582, 2006.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. **Curr Opinion Plant Biol.**, v. 5, p. 318-24, 2002.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 249–266, 2004.

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Mol Plant Pathol.**, v.6, p.335-345, 2005.

OSBOURN, A.E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **Plant Cell**, v.8, p.1821-1831, 1996.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v.3, n.3, p.156-160, 2001.

PARKER, J. E.; HOLUB, E. B.; FROST, L. N.; FALK, A.; GUNN, N. D.; DANIELS, M. J.. Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. **Plant Cell**, v.8, p2033-46, 1996

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds.) **Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 365-92, 1995.

PEART, J. R.; LUI, R.; SADANANDOM, A.; MALCUIT, I.; MOFFETT, P.; BRICE, D. C.; SCHAUSER, L.; JAGGARD, D. A. W.; XIAO, S.; COLEMAN, M. J.; DOW, M.; JONES, J. D. G.; SHIRASU, K.; BAULCOMBE, D. C. The ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. **Proc Acad Natl Sci.**, v. 99, p. 10865–10869, 2002.

PFÄFFL, M. W. Quantification Strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S.A. (Ed.). **The Real-Time PCR Encyclopedia A–Z of Quantitative PCR**. Published by International University Line, La Jolla, CA, pp. 87–120, 2004.

PRICE, K. R., JOHNSON, I. T.; FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance of saponins in food and feeding stuffs. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 26, p. 27-133, 1987.

SAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Review Food Sci. and Nutr.** v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. **Science**, Washington, v.270, n.20: p.467-470, 1995.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**. v. 3, p.1101-1108, 2008.

SCHWEIZER, P. Nonhost resistance of plants to powdery mildew—new opportunities to unravel the mystery. **Physiol Mol Plant Pathol.**, v.70, p.3-7, 2007.

SEIXAS, C.D.S.; GODOY, C.V. Vazio Sanitário: panorama nacional e medidas de monitoramento. Anais do Simpósio Brasileiro de Ferrugem Asiática da Soja. Londrina: Embrapa Soja. 132p. (**Documentos 281**), 2007.

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**. v. 34, n. 4, p. 1245-1247, 2004.

SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v.3, p.86-90, 1998.

SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A.; SANGLARD, D. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Identification of races of selected isolates of *Uromyces appendiculatus* from Minas Gerais (Brazil) based on the new international classification system. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 104-109, 2007.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v.268, n.5, p.661-667, May 1995.

STEIN, M.; DITTGEN, J.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, C.; HOU, B. H.; MOLINA, A.; SCHULZE-LEFERT, P.; LIPKA, V.; SOMERVILLE, S. *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. **The Plant Cell**, v.18, p.731–746, 2006.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GLAZEBROOK, J.; CHANG, H. S.; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGIRI, F. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell**, v.15, p.317–330, 2003.

THOMMA, B. P.; NELISSEN, I.; EGGERMONT, K.; BROEKAERT, W.F. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. **Plant Journal**, Oxford, v.19, n.2, p.163-171, 1999.

VAN ETEN, H.D.; MANSFIELD, J. W.; BAILEY, J. A.; FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus 'phytoanticipins'. **Plant Cell**, v.9, p.1191-1192, 1994.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.270, n.20, p.484-487, 1995.

VENKATACHALAM, P., THULASEEDHARAN, A., RAGHOTHAMA, K. G.: Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). **Planta**. v. 226, p. 499-515, 2007.

WEBER, A. P. M.; WEBER, K. L.; CARR, K.; WILKERSON, C.; OHLROGGE, J. B. Sampling the arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing. **Plant Physiology**, v.144, n.1, p.32-42, 2007.

WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fringerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.19, p.4965-4970, 1992.

WYNN. W. K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. **Phytopathology**, v.66, p.136- 146, 1976.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild

host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 52 - 56, 2002.

YANG, Y., SHAH, J. & KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes Dev.**, v.11, p.1621–1639, 1997.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, II, 2002, Foz do Iguaçu. Anais.Londrina: Embrapa CNPSoja. p.171-187, 2002.

YORINORI, J. T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja. 36p. (Documentos 247), 2004.

YUN, B. W.; ATKINSON, H. A.; GABORIT, C.; GREENLAND, A.; READ, N. D.; PALLAS, J. A., LOAKE, G. J. Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. **Plant J.**, v.34, p.768–777, 2003.

ZELLERHOFF, N.; HIMMELBACH, A.; DONG, W. B.; BIERI, S.; SCHAFFRATH, U.; SCHWEIZER, P., Nonhost resistance of barley to different fungal pathogens is associated with largely distinct, quantitative transcriptional responses, **Plant Physiol.** v.152, n.4, p.2053-66, 2010.

ZELLERHOFF, N.; JAROSCH, B.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W.; SCHAFFRATH, U. Nonhost resistance of barley is successfully manifested against *Magnaporthe grisea* and a closely related *Pennisetum*-infecting lineage but is overcome by *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p.1014-1022, 2006.

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. K. From Laboratory to Field. Using Information from *Arabidopsis* to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops. **Plant Physiology**, v.135, p.615-621, 2004.

ZHOU, N.; TOOTLE, T.L.; GLAZEBROOK, J. *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase.

Plant Cell, v.11, p.2419–28, 1999.

ARTIGO

**AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO
INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E O FUNGO *Uromyces
appendiculatus***

Artigo a ser submetido à revista Theoretical and Applied Genetics

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL ENTRE PLANTAS DE SOJA E O FUNGO *Uromyces appendiculatus*.

RESUMO:

A despeito da grande variedade de micro-organismos potencialmente patogênicos aos quais as plantas estão naturalmente expostas, a ocorrência de doenças representa exceção; a chamada resistência não-hospedeira é a forma mais comum e duradoura de resistência, uma vez que as plantas são imunes à maioria dos microrganismos, e suscetíveis apenas a uma pequena parcela destes. A grande importância científica e econômica que a resistência não-hospedeira representa torna necessário o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos nas interações entre planta e patógeno heterólogo. A cultura da soja, que é uma das mais importantes no cenário nacional, vem sofrendo grandes perdas de produção decorrentes do ataque do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da Ferrugem Asiática da Soja (FAS). Não existem, até o momento, cultivares de soja com resistência efetiva ao patógeno, e acredita-se que o entendimento dos mecanismos envolvidos nas interações não-hospedeiras, com a ajuda das técnicas modernas de biologia molecular, possam contribuir para solucionar este problema. No presente trabalho, investigou-se a interação da soja com o fungo heterólogo *Uromyces appendiculatus*, por meio de estudos fenotípicos e moleculares. As análises fenotípicas foram realizadas com o auxílio das técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, e sugerem a tentativa mal sucedida de penetração fúngica no tecido vegetal da soja. Para os estudos moleculares, foi proposta a análise de transcritos diferencialmente expressos, gerados por meio da construção de bibliotecas subtrativas e seqüenciados pela plataforma Solexa; além da expressão diferencial de importantes genes envolvidos na defesa contra patógenos, foi detectada a expressão de genes relacionados à resistência não-hospedeira. As análises de expressão por qRT-PCR mostraram a superexpressão

de *PEN2* e *PEN3* para o tempo 72 horas após a inoculação; estes dois genes atuam em cooperação num mecanismo de defesa pré-invasão, que envolve o transporte de substâncias tóxicas até a membrana plasmática em sítios de tentativa de penetração. O gene *BI-1*, que desempenha um papel importante na rota de resposta do retículo endoplasmático ao estresse, foi superexpresso nas horas iniciais de inoculação.

Palavras-chave: resistência não-hospedeira, soja, Ferrugem Asiática.

MICROSCOPIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF THE INCOMPATIBLE INTERACTION BETWEEN SOYBEAN PLANTS AND THE FUNGUS *Uromyces appendiculatus*.

SUMMARY:

Despite the vast range of potentially pathogenic microorganisms to which plants are naturally exposed, the occurrence of disease represents the exception. The so-called non-host resistance is the most common and durable type of resistance, since plants are immune to most organisms, and susceptible to only a small portion of them. Non-host resistance has a great scientific and economic importance, which makes essential to study the molecular basis of interactions between plants and heterologous pathogens. Soybean is one of the most important crop on the Brazilian agribusiness, and has been suffering great yield losses due to infection of *Phakopsora pachyrhizi* fungus, causal agent of Asian Soybean Rust (ASR). So far, there are no soybean cultivars with effective resistance against this pathogen, and it's believed that understanding the mechanisms involved in non-host interactions, with support of modern molecular biology techniques, may contribute to solve this problem. In this work, we investigated the interaction between soybean and the heterologous fungus *Uromyces appendiculatus*, through phenotypic and molecular studies. Phenotypic analyses were performed using optical and scanning electron microscopy techniques, and show the unsuccessful attempt of fungal penetration in plant tissue. For molecular studies, we performed the analysis of differentially expressed transcripts, generated by the construction of subtractive libraries, sequenced by Solexa technology. In addition to important genes involved in defense against pathogens, we detected the expression of genes related to non-host resistance. Analysis by qRT-PCR showed overexpression of *PEN2* and *PEN3* genes at 72 hours after inoculation. Both genes appears to work in co-operation in a pre-invasion defense mechanism which involves traffic of toxic compounds to the plasma membrane at sites of attempted invasion. The *BI-1* gene plays an important role in the conserved endoplasmic reticulum stress response pathway to modulate cell death, and was overexpressed in the initial hours of infection.

Keywords: non-host resistance, soybean, Asian Rust.

INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da agricultura, o homem precisa combater os patógenos que acometem as plantas cultivadas e causam perdas de qualidade e produção. Para controlar a incidência de pragas, diversas estratégias têm sido aplicadas, que consistem em métodos genéticos, químicos, biológicos, culturais e legislativos (HONÉE, 1999). Atualmente, tais métodos combinados são conhecidos como Manejo Integrado de Pragas e Doenças, e visam à maximização da produtividade com o mínimo possível de impacto ambiental. Uma das estratégias para controlar as doenças em plantas é a introdução de variedades resistentes a patógenos específicos, o que tem sido um dos principais focos dos programas de melhoramento clássico ao longo dos anos (JOHNSON, 2000).

No Brasil, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a cultura de maior destaque na economia, com produção recorde de 69,58 milhões de toneladas de grãos na safra 2009/10. (CONAB, 2010). A grande expansão da área de soja cultivada no Brasil e no mundo acarretou um aumento do número de doenças que afetam esta cultura. Desde que surgiu no Brasil, a Ferrugem Asiática da Soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., representa a doença fúngica de maior potencial de dano. É considerada a doença foliar mais agressiva em soja (MILES *et al.*, 2003), responsável por perdas de rendimento de até 70% (SOARES *et al.*, 2004).

O uso de cultivares resistentes ou tolerantes tem sido o método mais indicado para o controle da doença. Por décadas, a seleção para resistência foi baseada na introgressão de genes de resistência (genes R), que, no entanto, para alguns patossistemas, não confere durabilidade efetiva devido a mudanças na população do patógeno, que acaba tornando-se virulenta para as cultivares que carregam o gene (HULBERT *et al.*, 2001). Cinco *loci* independentes contendo alelos dominantes são descritos na literatura: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; MCLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA *et al.*, 2008, LAPERUTA *et al.*, 2008). Devido à natureza raça-específica destes genes, algumas variantes do patógeno podem ocasionalmente “quebrar” a resistência, como já ocorreu para os genes *Rpp1* e *Rpp3* no Brasil (YORINORI *et al.*, 2004).

Uma alternativa que se apresenta frente a volatilidade da resistência raça específica, é a resistência não-hospedeira (“non-host resistance”, ou NHR), que pode ser usada como um vantajoso recurso para aprimorar a resistência das plantas cultivadas (LOEHRER *et al.*, 2008). Esse tipo de resistência é assim referida quando todos os genótipos de determinada espécie de planta apresentam resistência contra todas as raças ou isolados de um dado patógeno. É, portanto, a forma mais comum e duradoura de resistência em plantas (HEATH, 2000). Este tipo de resistência que confere proteção robusta contra patógenos invasores apresenta diversas similaridades com a resistência hospedeira e, no entanto, é muito menos estudada e compreendida. Apesar dos progressos obtidos acerca da compreensão dos mecanismos de resistência gene-a-gene, ainda não está claro o motivo pelo qual um microrganismo completamente virulento para uma determinada espécie de planta não causa dano algum a outra espécie relacionada. Dessa forma, o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência não-hospedeira pode ser a chave para entender como as plantas se defendem de patógenos (MYSORE & RYU, 2004). A resistência não-hospedeira é altamente efetiva, motivo pelo qual se especula que seus mecanismos possam ser explorados para o desenvolvimento de culturas resistentes a doenças (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Sabe-se que este tipo particular de resistência é baseado em múltiplos mecanismos de defesa, compreendendo barreiras constitutivas e reações induzíveis (NÜRNBERGER *et al.*, 2004).

Dessa forma, foi proposto o estudo da interação entre plantas de soja e o fungo heterólogo *Uromyces appendiculatus* F. Strauss, causador da ferrugem do feijoeiro. Análises morfológicas e moleculares nos permitiram classificar a interação não-hospedeira como Tipo I, e validar a expressão diferencial de alguns genes já reconhecidamente relacionados aos mecanismos de resistência não-hospedeira em organismos modelo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e delineamento experimental

Para o experimento de construção da biblioteca subtrativa, o genótipo de soja PI 230970 (que contém o gene *rpp2* de resistência à FAS) foi semeado e cultivado em ambiente climatizado (fitotron), sob condições de temperatura ($24\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (>95%) controladas, e fotoperíodo de 12h, até o estágio de desenvolvimento V3 (30 dias). O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições (cada repetição contendo três replicatas), e estrutura de tratamentos em fatorial com dois fatores: tempo de coleta (1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após inoculação) e tipo de infecção (inoculado com uredósporos e inoculado com água – “mock”). Adicionalmente, para as análises de microscopia, foram cultivados, também no fitotron, vasos da cultivar de soja Embrapa 48 (suscetível à FAS), do cultivar de feijão Pinto 111 (suscetível universal à ferrugem do feijoeiro) e a da cultivar Diamante Negro (resistente à ferrugem do feijoeiro). As sementes de soja foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de Soja, localizado em Londrina, PR. Sementes das variedades de feijão foram gentilmente cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão.

Preparo dos inóculos e inoculação

Primeiramente foram preparadas as amostras da condição mock: com a ajuda de um borrifador manual, foi pulverizada uma solução de água destilada e 0,05% (v/v) de Tween 20 (Uniqema) sobre as superfícies adaxial e abaxial das folhas. Os vasos foram então cobertos com um saco plástico para conservar a umidade e evitar contaminação. O procedimento foi repetido para a condição de inoculação, usando-se uma suspensão de uredósporos de *Uromyces appendiculatus* em água destilada contendo 0,05% de Tween 20, a uma concentração de $7,9 \times 10^4$ uredósporos/mL. Os vasos inoculados foram também cobertos com sacos plásticos, mantidos até o tempo de 24 horas após inoculação (hai) (Figura 1).

Coletas das amostras

Para o experimento de expressão gênica (biblioteca subtrativa), amostras de tecido foliar foram coletadas nos tempos determinados acima, embaladas em papel

alumínio devidamente identificado, e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido, para posterior extração de RNA.

Para a realização de análises de microscopia, amostras das plantas de soja e feijão foram coletadas nos mesmos tempos utilizados para o experimento de expressão gênica, com os tempos adicionais de 7 e 15 dias, para acompanhar a possível formação de urédias em feijão e ocorrência de necrose em soja. De cada amostra coletada, foram feitos cortes de aproximadamente 5mm, armazenados em microtubos contendo uma solução fixadora de F.A.A. 50% (Formol, Álcool e Ácido Acético).



Figura 1: Montagem do experimento. a) fitotron; b) primeiras horas após a inoculação, plantas cobertas com sacos plásticos para conservar a umidade e criar um ambiente favorável ao desenvolvimento dos esporos; c) e d) plantas de soja após a retirada dos sacos plásticos

Análises microscópicas

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em alto vácuo foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina. Para observação, o material foi desidratado e seco. Após a lavagem das amostras em tampão fosfato 0,1M, para retirada da solução fixadora, foi feita a desidratação em série alcoólica crescente de Johansen (1940), com algumas modificações.

Após a desidratação, as amostras foram processadas em secador de ponto crítico de CO₂ (CPD 030 *Critical Point Dryer* – BALTEC), montados em suportes metálicos (“stubs”) e metalizados com camada de ouro. As análises e obtenção das imagens (eletromicrografias) foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, equipado com detector de elétrons secundários e retroespalhados (para alto e baixo vácuo) e de sistema de espectroscopia de raios X por dispersão de energia para microanálises.

Para análises por microscopia óptica, os cortes foram corados com “Coomassie Brilliant Blue”, segundo protocolo descrito por Wolf & Fric (1981), que permite uma boa visualização de estruturas como tubo germinativo e haustório.

Construção das Bibliotecas Subtrativas

O RNA total foi extraído de amostras de folhas usando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen). O RNAm foi isolado com a ajuda do kit FastTrack[™] MAG (Invitrogen). Após isolamento, o RNAm foi quantificado por espectrofotometria para avaliação da qualidade e quantidade de material purificado. A eficiência do isolamento de RNAm foi testada por meio de eletroforese em gel de agarose corado com 1% de Brometo de Etídio (EtBr).

Para a construção das bibliotecas subtrativas, as amostras de RNAm foram agrupadas em 3 “bulks”, conforme o tempo de coleta e tipo de inoculação (Figura 2). Cada “bulk” foi composto de quantidades equivalentes a 2 µg de RNAm de cada amostra. As bibliotecas subtrativas foram construídas com o kit PCR-Select[™] cDNA Subtraction (Clontech).

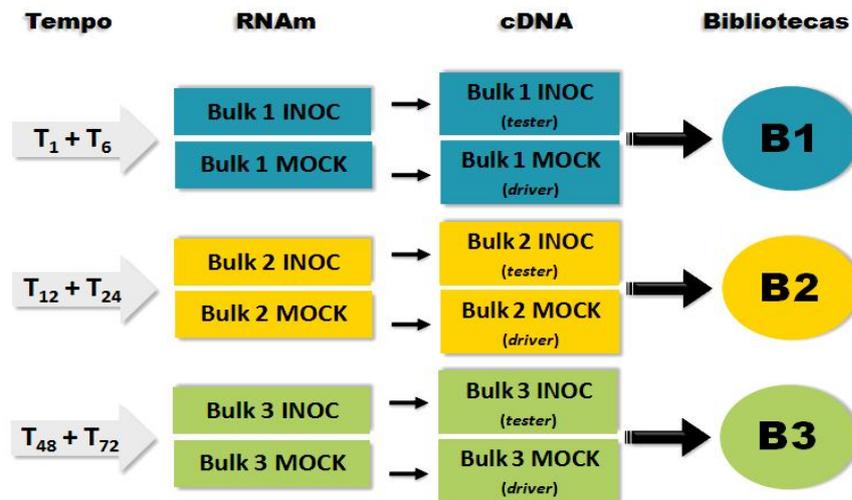


Figura 2: Esquema do agrupamento dos tempos para montagem dos “bulks” e construção das bibliotecas subtrativas.

Sequenciamento e análise de bioinformática

Os produtos de PCR de cada biblioteca foram preparados para a clonagem “in vitro” (FEDURCO *et al.*, 2006; TURCATTI *et al.*, 2008) e a subsequente reação de sequenciamento. As amostras foram sequenciadas com a tecnologia Solexa (Illumina; BENNETT, 2004) pela empresa FASTERIS (<http://www.fasteris.com>), aplicadas em uma canaleta do sequenciador Genome Analyzer GAII utilizando “single reads” e gerando fragmentos de 76 pb.

A montagem do transcriptoma e as análises “in silico” foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) da UNICAMP. Os dados foram depositados no banco de dados do projeto GENOSOJA/Embrapa Soja (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/soja/>). O genoma de referência, utilizado no banco de dados, foi construído utilizando etiquetas de sequências expressas (“Expressed Sequence Tags” - ESTs) depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os dados do genoma da soja disponibilizados pelo DOE Joint Genome Institute, no site do Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>).

As sequências (“reads”) produzidas foram ancoradas no genoma referência com auxílio do programa SOAP – “Short Oligonucleotide Alignment Program” (LI *et al.*, 2008) usando parâmetros que permitiram o alinhamento com no máximo dois “mismatches” entre as sequências. O programa EDENA – “Exact *DE Novo* Assembler” (HERNANDEZ *et al.*, 2008) foi utilizado para montar as sequências

mapeadas no genoma em “contigs”, com base nos parâmetros pré-definidos do programa.

Os dados foram anotados automaticamente no banco de dados do projeto GENOSOJA pela ferramenta AutoFACT (“Automatic Annotation and Classification Tool”; KOSKI *et al.*, 2005), que analisa dados de sequências de nucleotídeos e proteínas e determina a descrição funcional mais informativa, graças à combinação de relatórios de vários BLASTs provenientes de bancos de dados diversos. Posteriormente foi feita uma nova anotação automática, por parte da equipe do Laboratório de Bioinformática da Embrapa Soja, utilizando a ferramenta Blast2GO.

Alinhamento local de sequências conhecidas de genes de resistência não-hospedeira

Inicialmente, foi feita uma seleção de genes descritos na literatura como importantes para a resistência não-hospedeira em diferentes organismos. As sequências nucleotídicas desses genes, pesquisadas em bancos de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/), foram alinhadas com os dados das três bibliotecas com o auxílio do algoritmo Blastn (ALTSCHUL, 1990). Com base nos resultados de alinhamentos mais significativos foram selecionados alguns genes para validação por qRT-PCR.

Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para quantificar a expressão dos genes previamente selecionados, foi utilizado o método de qRT-PCR. Para a escolha dos melhores controles endógenos para normalizar as quantidades iniciais de cDNA foram testados cinco genes constitutivos: β -actina (acesso nº: GMU60500), β -tubulina (acesso nº: U12286.1), fator de alongação (EF-1b, acesso nº: EV279336), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, acesso nº: DQ224371.1) e RNAr 18S (acesso nº: X02623.1). As reações foram feitas em triplicatas, para cada uma das 3 repetições, e os dados foram analisados com a ajuda do algoritmo geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), o qual apontou a β -actina e β -tubulina como melhores opções, devido à maior estabilidade desses genes no presente experimento (Figura 3).

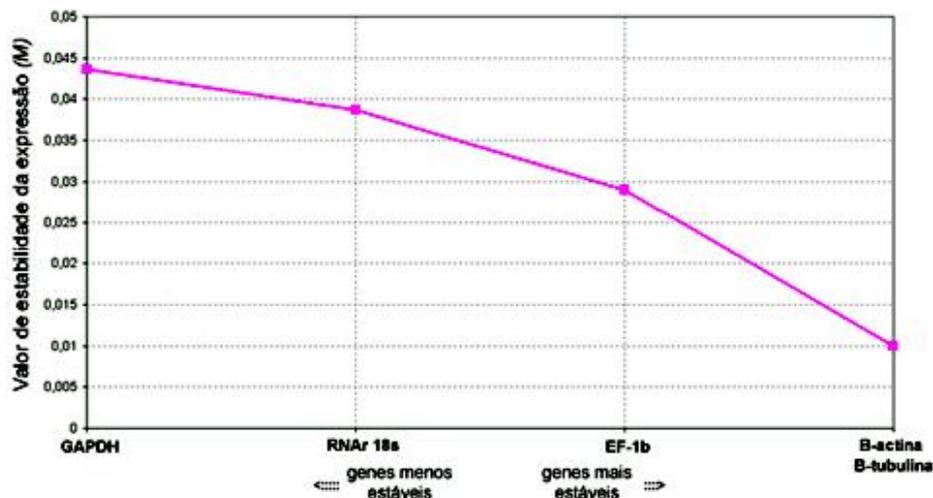


Figura 3: Valores de estabilidade da expressão (M) dos genes endógenos, de acordo com o algoritmo geNorm. Quanto menor o valor de M, mais estável é a transcrição do gene.

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para cada gene selecionado (Tabela 1), com o auxílio dos programas Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e Vector NTI Advance™ (Invitrogen).

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos desenhados para validação dos genes selecionados, com os respectivos Glyma que serviram de modelo, tamanho do amplicon (em pares de bases) e eficiência da reação de qRT-PCR.

Gene	Glyma	Oligonucleotídeos	Amplicon
PEN2	Glyma08g15960	5' GAATGGGATGCTGGTTACACA 3' 3' CATGTCAAAGGAACACTAAATTCAGA 5'	143 pb
PEN3	Glyma13g43870	5' TGTGCTGTTGTGGTTGCTGG 3' 3' CTTTGACGTTGGAGAAAGAGTTCA 5'	121 pb
ATAF1	Glyma13g35550	5' TTCGGCTAAAGATGGAGGGTAT 3' 3' GTGGCTAAGTAAGGGCTTGTATGG 5'	124 pb
BI-1	Glyma11g04040	5' TCGACTGAGAGGAATGAGAAGAAA 3' 3' GGAAAACACTGTATAGACGGCTGT 5'	124 pb

As reações foram realizadas em triplicata utilizando-se o *kit* Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), e o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). O RNA total (5 µg), previamente tratado com DNase,

foi utilizado para síntese de cDNA, segundo as especificações do fabricante do *kit* M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Os cDNAs obtidos foram diluídos (1:10) com água milli-Q. Em seguida, foi realizada a reação de qRT-PCR utilizando-se 1,0 μ L de cDNA como molde, 0,5 μ L de cada um dos oligonucleotídeos direto e reverso (concentração final de 0,02 μ M), 6,25 μ L de SYBR, 0,25 μ L de ROX (referência passiva) diluído dez vezes, e 4,0 μ L de água. As condições de amplificação atenderam aos seguintes parâmetros: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 62°C por 1 min. Ao final da reação, foi adicionada uma etapa de dissociação, na qual os produtos de amplificação de cada par de oligonucleotídeos iniciadores foram submetidos a temperaturas de 60 a 95°C. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas. As reações foram feitas para todos os tempos de coleta (1hai, 6hai, 12hai, 24hai, 48hai e 72hai).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Análises Fenotípicas

Aproximadamente 15 dias após a inoculação, as plantas de feijão utilizadas como controle apresentaram formação de urédias e esporulação (Figura 4a), o que comprova a viabilidade dos uredósporos utilizados no experimento. Houve formação de urédias tanto na cultivar de feijão suscetível (Pinto 111) quanto na cultivar considerada resistente (Diamante Negro) à ferrugem do feijoeiro. No entanto, a cultivar suscetível apresentou maior quantidade de urédias.



Figura 4: Análises macroscópicas. a) Urédias formadas sobre superfície adaxial de folha de feijão da cultivar Pinto 111, 13 dias após a inoculação. Aumento de 10X. b) Folhas de soja da cultivar PI230970 10 dias após a inoculação, sem qualquer indício de lesão.

Macroscopicamente, não foi observado nenhum indício de resposta de hipersensibilidade nas plantas de soja, o que visualmente sugere que a resistência não-hospedeira frente a *U. appendiculatus* seja classificada como “tipo I” (Figura 4b).

Embora nenhuma lesão tenha sido observada, as análises de amostras de soja por microscopia mostraram que a germinação dos esporos e a formação do tubo germinativo não foram comprometidas nesta planta não-hospedeira. Seis horas após a inoculação já foi possível observar o início da formação do tubo germinativo em ambos os genótipos de soja (Figura 5a). Em Embrapa 48, nota-se o crescimento do tubo germinativo a partir de 24 hai, muitas vezes ocorrendo de forma desorientada (Figura 5b, 5c e 5d).

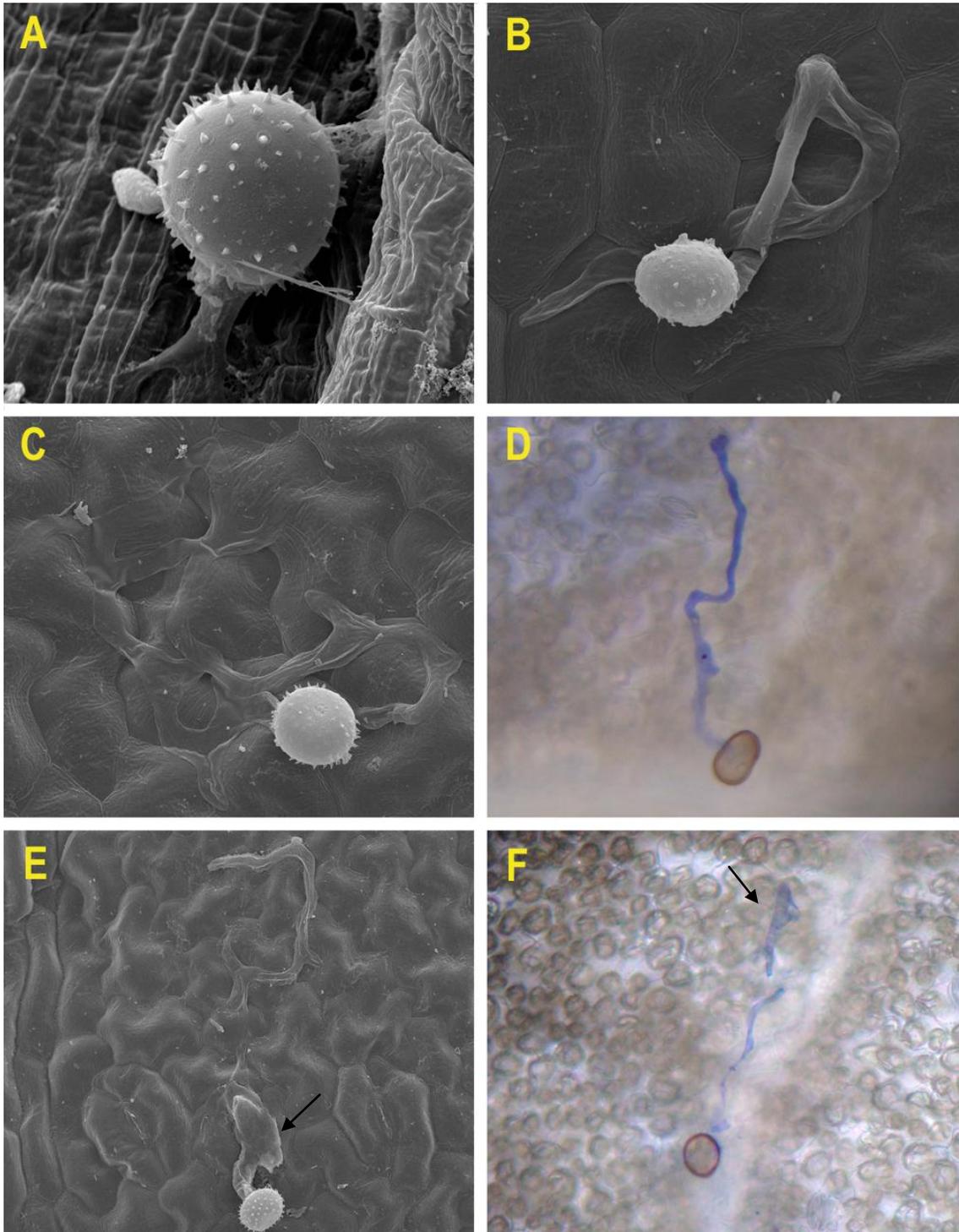


Figura 5: Análises microscópicas em folhas de soja. a) Micrografia eletrônica de varredura da superfície abaxial de folha de soja da cultivar Embrapa 48, 6h após inoculação com o fungo *U. appendiculatus*: é possível observar o início da formação do tubo germinativo; b), c) e d) crescimento do tubo germinativo sob superfície de folha da cultivar Embrapa 48, 24 hai, este último em imagem de microscopia óptica; e) micrografia eletrônica de varredura de folha de soja 24 hai, onde é possível visualizar a ocorrência de dilatação na estrutura do tubo germinativo (seta) f) imagem de microscopia óptica de PI 230970 48 hai, também evidenciando a dilatação na estrutura do tubo germinativo (seta).

Diversos estudos de microscopia óptica indicam que o comportamento dos tubos germinativos dos uredósporos na superfície da folha deve desempenhar um papel na resistência não-hospedeira das plantas (HEATH, 1977; WYNN, 1976). A MEV provou-se extremamente útil na análise desse fenômeno, e mostrou que a falta de crescimento direcional dos tubos germinativos de *U. appendiculatus* var. *typica* em folhas de trigo está relacionada com a falta de aderência destes na superfície da folha, e também com extrusões de cera na superfície da folha (WYNN, 1976).

Não há evidências satisfatórias para afirmar que o fungo forma apressório sobre folhas de soja, porém, imagens de MEV e MO mostram que ocorre uma dilatação do tubo germinativo em diversas ocasiões (Figura 5e e 5f). A presença dessas dilatações na estrutura do tubo germinativo pode indicar a tentativa mal sucedida de penetração no tecido, uma vez que, caso tal dilatação corresponda ao apressório, este não foi capaz de formar o haustório - responsável por lançar as hifas de infecção. Nesse caso, a tentativa de penetração foi contida antes da invasão e esta dificuldade está geralmente relacionada com respostas de defesa localizadas, tais como rearranjos no citoesqueleto, transporte de organelas, translocação de proteínas, processos de secreção e formação de papilas (HUECKELHOVEN, 2007 *apud* LIPKA *et al.*, 2010). A formação de deposições de parede celular não foi constatada, porém os dados de microscopia dão suporte à investigação molecular dos transcritos expressos na interação soja-*U. appendiculatus*.

Em amostras de feijão, a germinação dos esporos também foi verificada a partir de 6hai, e com 48hai e 72hai, foi verificada uma grande quantidade de esporos e tubos germinativos formados principalmente na cultivar suscetível (Figura 6a). Ao contrário de que se esperava, tanto a cultivar de feijão suscetível quanto a resistente apresentaram formação de urédias e grande quantidade de novos esporos sendo liberados (Figura 6b), embora tenha sido mais intensa na primeira.

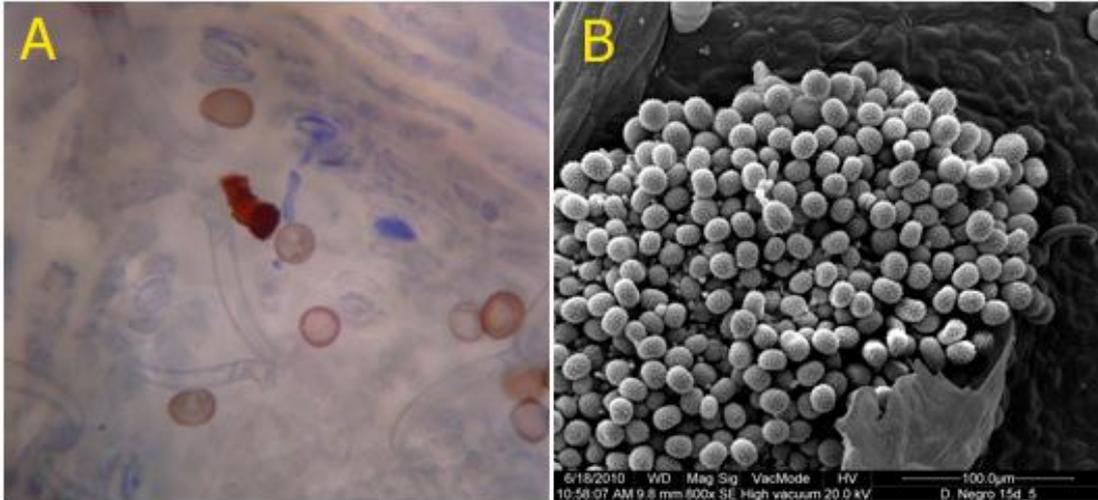


Figura 6: Análises microscópicas em folhas de feijão. a) Imagem de microscopia óptica de folha de feijão 72 hai, onde o tubo germinativo parece estar penetrando no estômato; b) micrografia eletrônica de varredura de folha de feijão Diamante Negro, 15 dias após inoculação: é possível observar a urédia formada e a liberação de novos esporos.

Análises Moleculares

Um dos objetivos principais desse trabalho foi investigar a resistência tipo não-hospedeira através da identificação de genes diferencialmente expressos em plantas de soja inoculadas com o fungo incompatível *U. appendiculatus*. Para isso foram construídas três bibliotecas subtrativas de plantas de soja do genótipo PI230970 na presença desse fungo. Esse genótipo foi escolhido por apresentar uma reação de resistência tipo HR durante a interação com o fungo da ferrugem asiática, mas que não apresentou nenhum sintoma quando inoculado com o fungo da ferrugem do feijoeiro.

A partir do sequenciamento das bibliotecas B1, B2 e B3 usando a plataforma Illumina Solexa, foram gerados milhões de “reads” de 76 bases, posteriormente alinhados no genoma de referência da soja por meio do programa SOAP e montados com a ajuda do programa Edena. Assim, foram formados um total de 2702 contigs, dos quais aproximadamente 50% apresentaram similaridade a modelos de genes do genoma referência, e puderam ser associados à denominação “Glyma” (Tabela 2). Verificou-se também que aproximadamente 5% das sequências não apresentaram similaridade com outras depositadas nos bancos de dados pesquisados pela anotação AutoFact, e podem corresponder tanto a regiões do

genoma da soja ainda não anotadas quanto a sequências do genoma do fungo. Estas sequências foram nomeadas como “no hits”.

Tabela 2: Informações sobre o sequenciamento das bibliotecas.

	B1	B2	B3	Total
Reads	4.679.963	4.878.530	4.355.862	13.914.355
bases sequenciadas	355.677.188	370.768.280	331.045.512	1.057.490.980
Contigs	445	402	1855	2702
sequências alinhadas	53%	54%	49%	51%
Unissequências	343	320	1283	1946

Os dados gerados com base na anotação das sequências podem apresentar certa redundância, uma vez que mais de um “contig” pode alinhar com o mesmo gene (porém em diferentes regiões). Assim, usamos a denominação “unissequências” para designar o total de resultados distintos gerados pela anotação via AutoFact: as unissequências, portanto, compreendem os resultados de genes não repetidos, e seu número total é menor que o número de “contigs” (Figura 7). É possível observar que a biblioteca 3 apresenta uma quantidade contigs e unissequências muito superior à das bibliotecas 1 e 2, apesar de ser esperado que uma maior quantidade de dados fosse gerada das horas iniciais do experimento.

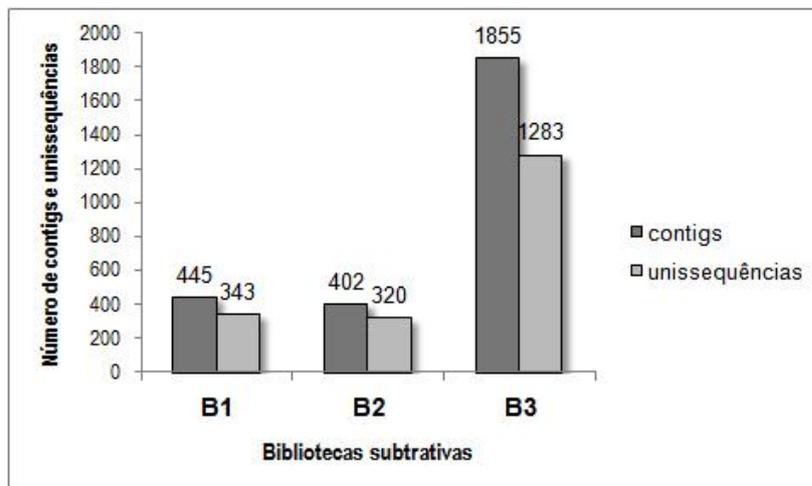


Figura 7: Números totais de contigs e unissequências distribuídas por biblioteca subtrativa.

Verificou-se, com o auxílio da ferramenta Venny (OLIVEROS, 2007) que vários desses contigs e unissequências são comuns entre as diferentes bibliotecas, enquanto outras são exclusivas de cada biblioteca (Figura 8).

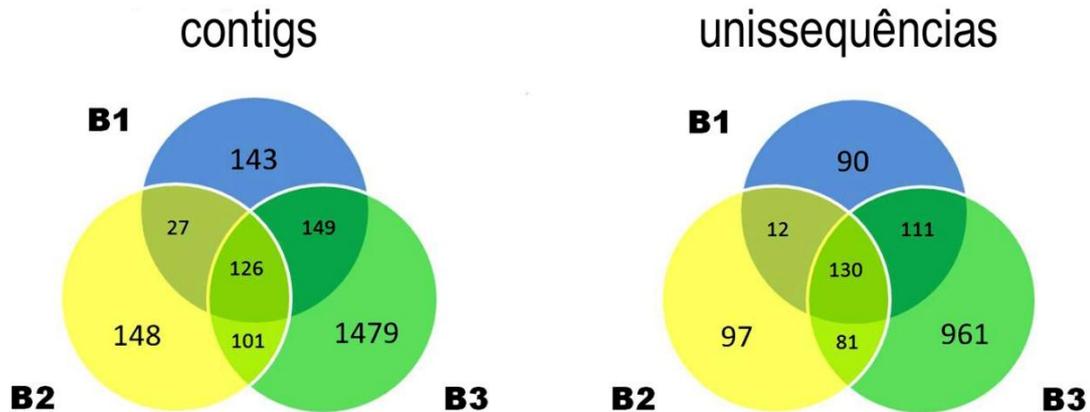


Figura 8: Número de contigs e unissequências obtidas nas bibliotecas subtrativas.

Nas três bibliotecas construídas, a principal função molecular encontrada foi a de atividade catalítica (GO:0003824), cujas sequências foram distribuídas em seis classes: hidrolases, isomerases, liases, ligases, oxidoredutases e transferases (Figura 9). As sequências com atividade catalítica bem representadas entre as bibliotecas foram: as de oxidoredutase; transferase, incluindo principalmente proteínas quinase, que englobam as proteínas com atividade de serina/treonina quinase; e hidrolase.

Além de atividade catalítica, outra função molecular muito frequente é a de ligação (GO:0005488), que nas bibliotecas presentes engloba, principalmente, a função de ligação a nucleotídeos, mas também: ligação a proteína; ligação a ácidos nucleicos; e ligação a íons magnésio e ferro. A atividade de transportador (GO:0005215), responsável pelo transporte direcionado de substâncias tais como micro e macromoléculas e íons para dentro, fora ou entre as células, é atribuída a grande parte dos transcritos diferencialmente expressos.

Com relação aos processos biológicos, a maioria das sequências está envolvida em processos metabólicos, transporte de elétrons, resposta ao estresse (GO:0006950) e regulação da transcrição (GO:0045449).

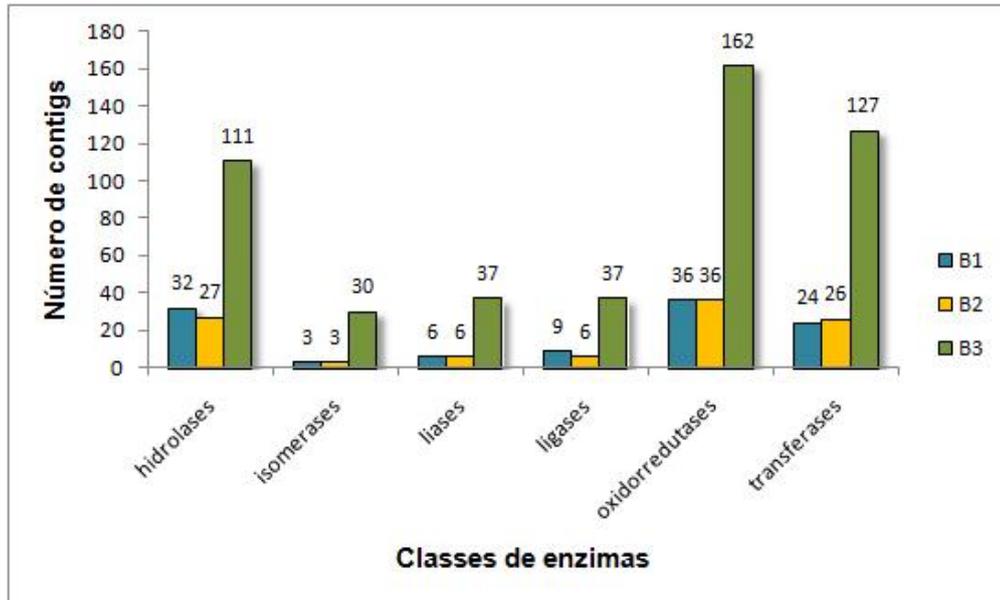


Figura 9: Distribuição das principais classes de enzimas nas três bibliotecas subtrativas.

Genes Envolvidos em Processos Relacionados à Defesa Contra Patógenos

As respostas a estresses em plantas são reguladas por múltiplas vias de sinalização e existem sobreposições entre os padrões de expressão induzidos nas plantas em resposta a diferentes estresses, mostrando a existência de redes regulatórias complexas que permitem que a planta possa responder de forma adequada a um ambiente em constante mudança.

Com base na anotação GO foi possível agrupar conjuntos de genes com função semelhante, ou seja, categorizar as sequências gênicas das bibliotecas (Figura 10). O critério utilizado nesta etapa foi a distribuição de classes de genes envolvidos em mecanismos de interação planta-patógeno nas diferentes bibliotecas.

Mesmo não ocorrendo a indução de resposta de hipersensibilidade por determinado patógeno, como no caso da resistência não-hospedeira do tipo I, a indução da expressão de genes relacionados à defesa é esperada (OH *et al.*, 2006).

Dentre as classes de genes analisadas, os fatores de transcrição, as fosfatases, as quinases e as proteínas heat shock se destacaram, apresentando uma média superior a 2% dos contigs totais nas três bibliotecas (Figura 10). A considerável porcentagem de sequências diferencialmente expressas relativas aos fatores de transcrição é justificável, principalmente nas horas iniciais e intermediárias

de interação com o patógeno, pois a planta precisa ativar uma complexa série de respostas de defesa, o que acontece completamente dentro das primeiras 24 horas (BUCHANAN *et al.*, 2000).

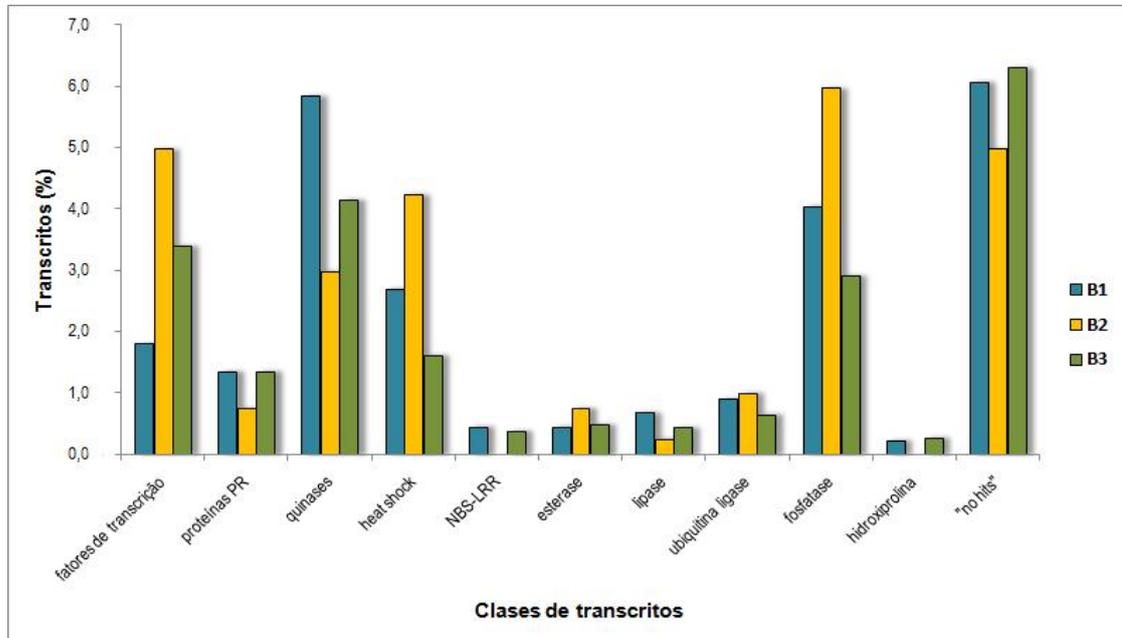


Figura 10: Principais classes de transcritos encontrados em cada uma das 3 bibliotecas subtrativas, mostrados em porcentagem; proteínas PR aqui incluem: quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases e lipoxigenases.

Uma outra classe de proteínas que se destacou bastante nas bibliotecas foram as quinases, que são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP (em raros casos), para resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser). A cascata MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno; “mitogen-activated protein kinase”) é assim chamada porque existem uma série de proteínas quinases que se fosforilam mutuamente em uma sequência específica: primeiramente a MAPKKK fosforila a MAPKK, que por sua vez fosforila a MAPK. Esta última penetra no núcleo, onde ativa outras quinases, fatores de transcrição específicos e proteínas reguladoras (TAIZ & ZEIGER, 2009). As MAPKs constituem um dos pontos centrais de “cross-talk” na sinalização do estresse, incluindo os que resultam em proteção contra invasão de microrganismos (GOMEZ-GOMEZ & BOLLER, 2002; JONAK *et al.*, 2002; *apud* NÜRNBERGER & LIPKA, 2005).

Também se destacaram as fosfatases, que apresentaram várias enzimas diferencialmente expressas nas três bibliotecas. Muitas vias de sinalização celular têm sua regulação devida à ação das enzimas fosfatase, que por meio da fosforilação/desfosforilação de proteínas podem gerar “motifs” de reconhecimento para interação proteína-proteína, controlar a estabilidade proteica e modular a atividade de enzimas (ZHANG, 2002 *apud* AOYAMA *et al.*, 2003).

As proteínas de choque térmico – “heat-shock proteins” (Hsps) são altamente conservadas, e expressas nas células expostas a altas temperaturas ou outras condições de estresse ambiental (COOPER, 2000). Atuam na estabilização e facilitação da renaturação das proteínas desnaturadas em função desses estresses, mas desempenham papéis inclusive em células sob condições normais de crescimento, como o dobramento de proteínas recém-sintetizadas e transporte intracelular. As famílias de proteínas heat-shock são Hsp60, Hsp70 e Hsp90, coletivamente chamadas de chaperonas moleculares.

Maimbo e colaboradores (2007) descreveram o envolvimento direto de Hsps na interação entre plantas de tabaco e *Ralstonia solanacearum*, onde foi demonstrada a expressão aumentada de Hsps de 17 kDa em folhas de tabaco durante interações compatíveis e incompatíveis com duas cepas desta bactéria: uma que induz HR e outra, não patogênica, que não induz. Este resultado sugere um papel para as Hsps durante a indução das respostas de imunidade basal como as induzidas durante o reconhecimento de PAMPs. Kanzaki *et al.* (2003) sugerem que o comprometimento da resistência de plantas de tabaco silenciadas para os genes NbHsp90c-1e NbHsp70c- 1 contra um patógeno não-hospedeiro pode ser causada pela reduzida expressão de genes relacionados à defesa, incluindo genes de proteínas PR.

Dentre as vias metabólicas ativadas em respostas de defesa de plantas a patógenos estão a do ácido jasmônico, do ácido salicílico, a síntese de fitoalexinas e a expressão de proteínas PR. No presente estudo, várias proteínas relacionadas a essas vias foram identificadas (Tabela 3), como a aleno oxido ciclase (AOC), envolvida na via do ácido jasmônico; lipoxigenase (LOX), também participante da via do jasmonato; chalcona sintase (CHS), envolvida na síntese do ácido salicílico; e a fenilalanina amônia liase (PAL), envolvida na síntese do ácido salicílico e de

fitoalexinas. Também foi investigada a presença de algumas proteínas PR, tais como: β -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase e inibidores de proteinase. Outros genes importantes no processo de defesa das plantas contra agentes patogênicos que tiveram sua expressão diferencial investigada foram: proteínas de choque térmico e proteínas com domínio NBS-LRR, codificadas pela maioria dos genes de resistência *R*.

Tabela 3: Presença de sequências gênicas relacionadas a proteínas envolvidas em vias metabólicas de respostas de defesa de plantas ao ataque de patógenos.

enzima	B1	B2	B3	Total
Aleno oxido ciclase (AOC)	–	–	1	1
Chalcona sintase (CHS)	–	1	3	4
Lipoxigenase (LOX)	2	2	5	9
β -1,3-glucanase	1	1	1	3
Quitinase	1	–	1	2
Peroxidase	4	2	10	16
Inibidores de proteinase	–	–	4	4
Fenilalanina amônia liase (PAL)	1	–	2	3
Superóxido-dismutase (SOD)	–	–	4	4
Quinases	26	12	77	115
Proteínas “heat shock”	12	17	30	59
Proteínas NBS-LRR	1	–	4	5

O ácido jasmônico (JA) é produzido em resposta à patogênese e à herbivoria, sendo que os jasmonatos são responsáveis por mediar respostas de defesa contra insetos, fungos e bactérias (FARMER *et al.*, 2003). Os jasmonatos são sintetizados nas plantas pela via octadenoide: determinados estímulos ativam fosfolipases, levando à liberação de ácido linolênico dos lipídeos da membrana. O ácido linolênico é convertido em ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) através da ação das enzimas lipoxigenase (LOX), aleno oxido sintase (AOS) e aleno oxido ciclase (AOC), a partir do qual é sintetizado o JA (CHEONG & CHOI, 2003, DEVOTO & TURNER, 2003). Nesse trabalho foi verificado que a enzima AOC encontra-se representada na biblioteca B3, o que sugere a sua expressão diferencial apenas nos tempos mais

avançados do experimento (entre 48 e 72 hai). Os jasmonatos (JA e seus homólogos estruturais) são conhecidos por sua influência em vários processos fisiológicos da planta, e o JA foi proposto como mediador nas plantas a respostas de defesa contra ferimento e ataques de patógenos (FARMER & RYAN, 1992; KAUSS *et al.*, 1992 *apud* SARAVITZ & SIEDOW, 1996). A transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo de defesa vegetal é induzida por JA, e entre os genes ativados estão aqueles que codificam importantes enzimas-chave nas principais rotas de metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2009). O JA também ativa a expressão de inibidores de proteinase, que impedem a degradação da parede celular do vegetal, e conseqüentemente, a invasão do patógeno. A presença de quatro seqüências relacionadas a inibidores de proteinase observada apenas na biblioteca B3 está em concordância com a expressão da enzima AOC citada acima, e sugere que o JA desempenhou papel relevante nas horas tardias do experimento.

A expressão diferencial de LOX, no entanto, é constatada para as três bibliotecas, o que pode estar relacionado com seu papel em outras rotas, como a das enzimas oxidativas, ou na produção de moléculas antimicrobianas derivadas de ácidos graxos (SARAVITZ & SIEDOW, 1996). Assim, acredita-se que esteja havendo ativação de rotas metabólicas para a síntese de metabólitos secundários tóxicos, para tentar conter a entrada do fungo desde as horas iniciais de inoculação.

A rota de biossíntese de fenilpropanoides também foi investigada. Os fenilpropanoides são compostos que desempenham diversos papéis no crescimento e desenvolvimento da planta. Como exemplos, temos as ligninas, que contribuem para a integridade estrutural e funcionam como barreiras contra microrganismos; pigmentos flavonoides, para coloração e proteção UV; e fitoalexinas, como antimicrobianos (HAHLBROCK & SCHEEL, 1989). Compostos fenilpropanóides também atuam como sinalizadores nas interações planta-microrganismo (ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALAN, 1991). Duas enzimas chave na biossíntese de fenilpropanoides são a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a chalcona sintase (CHS) (SMITH & BANKS, 1986 *apud* ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALAN, 1991), cuja expressão diferencial foi observada nas bibliotecas (Tabela 2). Todos os fenilpropanoides derivam do ácido cinâmico, que é formado quando a PAL retira uma amônia da fenilalanina. Na reação seguinte da rota, a CHS condensa três moléculas de malonyl-CoA com cinamoyl-CoA, produzindo chalcona, uma molécula de 15 carbonos, utilizada pelas enzimas subsequentes, entre elas a

chalcona isomerase (CHI), na rota de síntese dos chamados fenilpropanóides estresse-induzidos (ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALAN, 1991).

Em várias espécies, PAL e CHS são codificadas por famílias multigênicas, e cada gene individual é diferencialmente regulado e utiliza diferentes sinais para indução (KREUZALER *et al.*, 1983). A expressão de PAL foi detectada já nas horas iniciais de interação não-hospedeira. Esta enzima encontra-se em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de maneira que sua ação catalisadora é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. Sua atividade é aumentada pela infecção com fungos, e o ponto de controle parece estar no início da transcrição: a tentativa de invasão por fungos desencadeia a transcrição do RNAm que codifica a PAL, aumentando sua quantidade na planta, e portanto, estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Na biblioteca B3, tanto PAL quanto CHS foram identificadas, o que sugere que a ativação da rota de biossíntese de fenilpropanóides ocorre principalmente após 48 h. A presença de PAL em B1 pode estar relacionada com sua participação na biossíntese de lignina, uma vez que uma provável cinamil álcool desidrogenase (CAD) também foi encontrada nessa biblioteca.

Das alterações decorrentes da interação planta-patógeno, a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) parece ser a mais evidente. Dentre as proteínas PR ativadas pelos indutores encontram-se as hidrolases β -1,3-glucanase e quitinase, que promovem a desorganização da parede celular dos patógenos

Os substratos das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase são, respectivamente, a quitina e a β -1,3-glucana, os maiores componentes da parede celular da maioria dos fungos. Assim, existem fortes evidências de que estas duas enzimas exerçam um papel fundamental na defesa contra esses patógenos (ABELES *et al.*, 1971 *apud* MARTINS, 2008). Estas hidrolases são produzidas simultaneamente, próximas aos sítios de infecção no hospedeiro, acumulando-se ao redor da parede celular dos fungos (BENHAMOU *et al.*, 1989 *apud* MARTINS, 2008). No patossistema soja-*U. appendiculatus* a expressão de quitinase e β -1,3-glucanase ocorre durante todo o intervalo de tempo compreendido no presente experimento; com a degradação da parede celular do fungo por ação dessas enzimas, a liberação de oligossacarídeos pode ter exercido atividade elicitora do sistema de defesa da planta.

Peroxidases também foram identificadas nas bibliotecas. Essas enzimas podem estar diretamente envolvidas no processo de lignificação da parede celular e são conhecidas por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (HOAGLAND, 1990 *apud* SCHWAN-STRADA *et al.*, 2008). Ela catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina. Mudanças na atividade de peroxidases têm sido frequentemente correlacionadas a respostas de resistência/suscetibilidade em diferentes patossistemas. Acerca da biossíntese de lignina, um polímero complexo formado principalmente de unidades de fenilpropanoides, as peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de H dos grupos alcoóis hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar lignina (GOODMAN *et al.*, 1986). O aparecimento de transcritos relacionados a enzimas com atividade de peroxidase apareceu principalmente na biblioteca B3, mas também na biblioteca referente às horas iniciais de interação (B1). Estes resultados sugerem que a biossíntese de lignina tenha sido induzida, o que é reforçado pelo fato de que uma provável cinamil álcool desidrogenase (CAD), também envolvida na etapa enzimática da síntese de lignina, foi encontrada nesses mesmos tempos. A lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de várias maneiras, seja pelo estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e crescimento do patógeno, seja pela modificação da parede celular para torná-la mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas. A presença de transcritos correspondentes a genes dessas duas enzimas pode indicar a formação de papilas para evitar a penetração do fungo.

Também foi encontrada a expressão diferencial de Superóxido Dismutase (SOD) na biblioteca B3, que pode ser devido à sua indução por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em geral, o ataque de patógeno leva a um acúmulo de radicais superóxido, e a planta precisa então expressar (SOD) para convertê-los em H_2O_2 , protegendo a célula dos efeitos tóxicos deste radical. Segundo BAKER & ORLANDI (1995), as espécies reativas de oxigênio são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). As ROS correspondem a uma das primeiras respostas ativadas em muitas interações incompatíveis. Existem inúmeras fontes potenciais: as fontes protoplásticas, representadas pelas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos; as NADPH oxidases e as superóxido sintases NADH-dependentes da membrana celular; e fontes apoplásticas de

geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), incluindo peroxidases, amino oxidases e oxalato sintases. Os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são produzidos em interações não compatíveis, e normalmente dismutados rapidamente – de modo não enzimático ou através da ação da superóxido dismutase (SOD) – a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, por não ser eletricamente carregado, é capaz de atravessar membranas biológicas facilmente.

A geração de ROS pode resultar em dano considerável ao hospedeiro e ao patógeno, ao reagirem com proteínas, reduzindo a atividade de enzimas; com lipídeos, desestabilizando as membranas; e com o DNA, podendo causar mutações (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). Outros papéis importantes das ROS são: reforço da parede celular, uma vez que peróxido de hidrogênio é essencial para a formação de precursores de lignina; ativação de uma cascata de sinalização mediada pelo ácido salicílico (“Salicylic Acid” ou SA), uma vez que aumenta a atividade da enzima BA2-H (“benzoic acid-2 hydroxylase”), envolvida na biossíntese do SA (LÉON *et al.*, 1995); ativação de mecanismos de proteção celular contra sua própria toxicidade. As ROS também levam à alteração do potencial redox na célula, relacionada com a ativação de fatores de transcrição – desempenhando assim uma atividade de sinalização (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

Genes Relacionados à Resistência Não-Hospedeira

Além da investigação de genes relativos ao processo geral de defesa contra patógenos diferencialmente expressos nas bibliotecas subtrativas também foram investigados genes com potencial envolvimento específico em resistência não-hospedeira. Para tanto, foram feitas buscas na literatura e os genes relacionados à resistência não-hospedeira encontrados tiveram suas sequências nucleotídicas comparadas com as bibliotecas subtrativas. Isso possibilitou a seleção de quatro deles para análise quanto à expressão diferencial em soja quando infectada com *U. appendiculatus* (Tabela 4).

Tabela 4: Genes envolvidos no mecanismo de resistência não-hospedeira, cujas sequências melhor se alinham com sequências geradas nas bibliotecas subtrativas. Blastn realizado em 09/2010

Gene	Nº de acesso no GeneBank	Produto	Organismo	Biblioteca
<i>PEN2</i>	NM_130012.3	Glicosídeo hidrolase família 1	<i>A. thaliana</i>	B1, B3
<i>PEN3</i>	NM_104680.2	Transportador ABC do tipo PDR	<i>A. thaliana</i>	B1, B2, B3
<i>ATAF1</i>	NM_100054.2	Fator de transcrição da família NAC	<i>A. thaliana</i>	B1, B2, B3
<i>BI-1</i>	AJ290421.1	BAX Inibidor 1	<i>Hordeum vulgare</i>	B3

O primeiro passo da quantificação da expressão desses genes por qRT-PCR foi verificar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos. Para tanto, foi preparado um conjunto das amostras de cDNA, do qual foram feitas diluições seriadas da ordem de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . A eficiência foi calculada de acordo com a fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100\%$ (PFAFFL, 2001), de maneira que *PEN2* apresentou eficiência de 88,19%, *PEN3* de 90,66%, *ATAF1* de 72,89% e *BI-1* de 98,5%. Após as reações de amplificação, os produtos foram submetidos à análise de dissociação, a fim de verificar a ocorrência de amplificações não específicas ou de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores.

A resistência não-hospedeira pode ser dividida em resistência à penetração, quando existem barreiras limitando a entrada do patógeno na célula, e resistência pós-penetração, determinada por mecanismos que atuam intracelularmente se a resistência à penetração foi superada (LIPKA *et al.*, 2005). Um grupo diverso de genes que contribuem para a resistência não-hospedeira foi identificado, tanto pelo estudo de mutantes com falhas em várias funções de defesa, quanto pela busca de mutantes comprometidos especificamente para a resistência não-hospedeira (STEIN *et al.* 2006). Dentre esses genes, foram selecionados os genes *PEN2*, *PEN3*, *ATAF1* e *BI-1* para a avaliação da expressão gênica.

Para a avaliação da expressão dos genes selecionados, foi utilizado o método de quantificação relativa, no qual se obtêm um valor de expressão por meio da comparação entre o C_T do cDNA das plantas inoculadas em relação ao controle "mock", denominado calibrador (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). As análises foram

feitas com ajuda do programa REST 2009 (Qiagen), e os resultados estão ilustrados na figura 11.

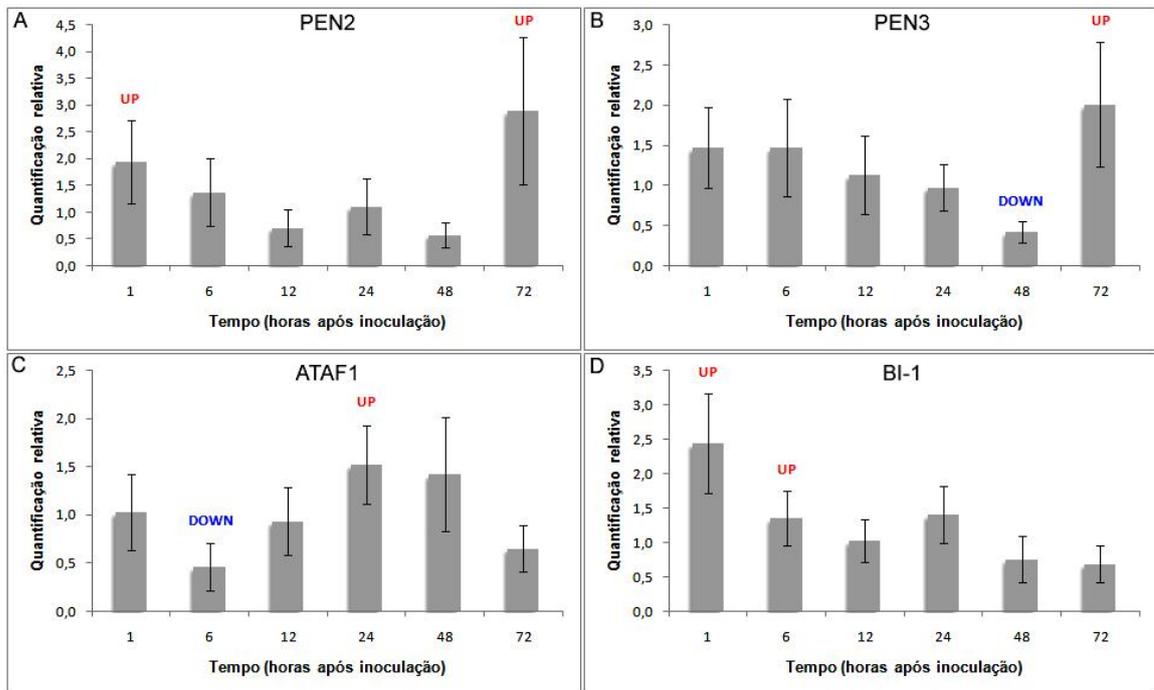


Figura 12: Níveis de expressão dos genes PEN2 (a), PEN3 (b), ATAF1 (c) e BI-1 (d), quantificado por qRT-PCR em cada um dos tempos de inoculação.

As glicosil hidrolases PEN2, localizadas nos peroxissomos, atuam como componentes do mecanismo de resistência induzido de pré-invasão. Após isolamento e clonagem, determinou-se que PEN2 codifica para uma das 48 famílias preditas de glicosil hidrolases (F1GH) em *Arabidopsis*. Neste organismo, PEN2 restringe a entrada de dois ascomicetos causadores de oídio, que na natureza colonizam espécies de gramíneas e ervilhas (LIPKA *et al.*, 2005). Posteriormente, um terceiro mutante foi isolado e mostrou que PEN3 codifica um provável transportador ABC do tipo PDR. Existem evidências de que PEN1 e PEN2 atuam em dois mecanismos distintos de controle de entrada, e que PEN2 atua em cooperação com PEN3 (LIPKA *et al.*, 2005; STEIN *et al.*, 2006).

Quando foi realizado o Blastn local com a sequência do gene *PEN2* de *Arabidopsis*, foram encontradas sequências relativas a transcritos diferencialmente expressos nas bibliotecas B1 e B3. Em B1, foi encontrada similaridade com o “contig” ancorado no modelo de gene Glyma07g11310.1 e em B3, com o

Glyma08g15960.1. O desenho dos oligonucleotídeos para a validação deste gene foi baseado na sequência deste segundo Glyma (cujo alinhamento apresentou maior *e-value*). A figura 12a mostra que *PEN2* foi superexpresso nos tempos 1h e 72h (Figura 12a).

Em *Arabidopsis thaliana*, *PEN3* codifica um cDNA de 4.3kb, que dá origem a uma proteína de 1469 aminoácidos com 13 domínios transmembrana. Foi inicialmente anotado como PDR8 devido à homologia com os transportadores PDR de leveduras (VAN DEN BRULE & SMART, 2002 *apud* STEIN *et al.*, 2006). Transportadores ABC podem estar localizados no tonoplasto, mitocôndria, cloroplastos e membrana plasmática e estudos mais recentes de proteômica localizaram *PEN3* também na membrana plasmática, mitocôndrias e cloroplastos (BRUGIERE *et al.*, 2004; KLEFFMANN *et al.*, 2004). Estudos acerca do subgrupo PDR de transportadores ABC em *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana plumbaginifolia* sugerem que eles desempenham funções na exportação de metabólitos secundários tóxicos da planta e/ou na desintoxicação de toxinas do patógeno.

A sequência do gene *PEN3* de *Arabidopsis* foi comparada com as bibliotecas geradas, e foram encontradas sequências similares nas três bibliotecas. No entanto, novamente as sequências se alinharam em mais dois modelos de genes (Glyma14g15390.1 e Glyma13g43870.1), sendo que este último foi usado para o experimento de validação do gene. Nesse caso, foi verificada uma expressão diferenciada apenas para o tempo de 72h (Figura 12b).

Assim, com base nesses resultados, tanto *PEN2* quanto *PEN3* apresentaram uma expressão aumentada no tempo 72h, o que traz fortes evidências de que ambos podem estar atuando em cooperação.

A localização de *PEN3* na membrana plasmática e seu acúmulo em sítios de penetração dão suporte à hipótese de que esta proteína exporta componentes de defesa de forma localizada em sítios de tentativa de invasão. Foi proposto um modelo bioquímico, em *Arabidopsis*, no qual a glicosil hidrolase *PEN2* converte um substrato não tóxico em um produto tóxico, que é então exportado por *PEN3*, intoxicando as estruturas de penetração à medida que estas tentam atravessar a parede celular (STEIN *et al.*, 2006) (Figura 13).

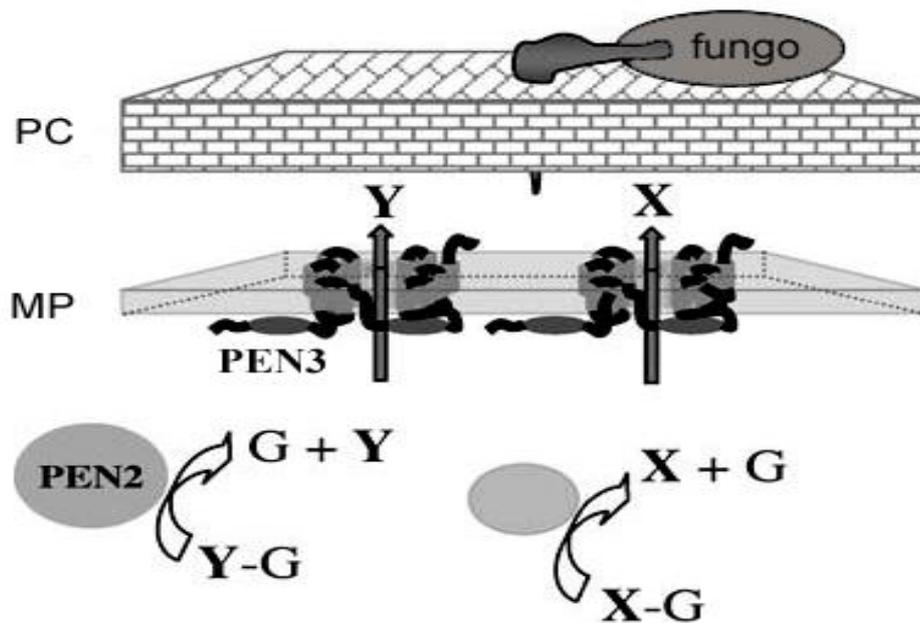


Figura 13: Modelo proposto para a atuação conjunta de PEN2 e PEN3. PEN3 é um transportador ABC (localizado na membrana plasmática) que exporta metabólitos secundários ou outros materiais tóxicos (representados por X e Y) para o apoplasto, nos sítios onde há tentativa de invasão por patógenos. Os transportadores ABC podem transportar uma variedade de componentes relacionados, o que leva a crer que PEN3 também exportem uma variedade de compostos químicos relacionados, que podem variar em toxicidade. A glicosil hidrolase PEN2 pode ativar algumas dessas toxinas (Y) pela hidrólise de algum metabólito precursor não tóxico (Y-G). Assume-se que outras enzimas ativem toxinas relacionadas (X). (adaptado de STEIN *et al.*, 2006). PC: Parede Celular; MP: Membrana plasmática.

Uma provável justificativa para a superexpressão de PEN2 no tempo 1h (Figura 12a) pode ser sua recém-descoberta participação em uma rota do metabolismo de glicosinolatos, onde seu papel de mirosinase é necessário para a ativação de indóis derivados de triptofano (BEDNAREK *et al.*, 2009). Um componente central nesta rota é o gene CYP81F2 de *Arabidopsis*, que codifica uma P450 mono-oxigenase necessária para o acúmulo (induzido por patógeno) de 4-metil-3-ilmetilglicosinolato, substrato de PEN2. O substrato é ativado pela atividade atípica de mirosinase de PEN2, para defesa contra fungos (BEDNAREK *et al.*, 2009; CLAY *et al.*, 2009). A expressão diferencial de sequências correspondentes a citocromo P450 mono-oxigenases acontece nas três bibliotecas.

Os fatores de transcrição da família NAC são conhecidos por seu envolvimento em vários processos de crescimento ou desenvolvimento, e na regulação da resposta a estresses ambientais. Os membros desta família possuem um domínio NAC N-terminal conservado, e a subfamília ATAF participa como

importante reguladora das respostas das plantas ao ataque de patógenos (DELESSERT *et al.*, 2005). Jensen *et al.* (2007) forneceram evidências de que o fator de transcrição *HvNAC6* de cevada desempenha um papel direto na regulação da defesa basal. Seu homólogo em *A. thaliana*, *ATAF1*, é induzido durante o ataque do fungo biotrófico heterólogo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. As análises de bioinformática indicaram a expressão diferencial de fatores de transcrição da família NAC durante todos os tempos correspondentes à construção das bibliotecas. O experimento de qRT-PCR, por sua vez, indicou a supressão de *ATAF1* para o tempo 6, e a superexpressão para o tempo 24h (Figura 11c). A verificação de alinhamentos significativos nas três bibliotecas pode ser devida à presença de mais de um homólogo de *ATAF1* em soja, e uma vez que procura-se desenhar o oligonucleotídeo em regiões não-conservadas, apenas um desses homólogos foi amplificado durante a reação de PCR em tempo real, o que pode justificar os resultados diferentes. Outro fator importante a ser considerado é que a eficiência para o oligonucleotídeo desse gene foi relativamente baixa (72,89%).

BAX Inibidor-1 (BI-1) é uma proteína da membrana do retículo endoplasmático (RE) e representa um regulador ancestral da morte celular programada em todos os eucariotos. Descobertas recentes indicam que BI-1 desempenha um papel importante na rota de resposta do retículo endoplasmático ao estresse, para modular a indução da morte celular em resposta a múltiplos tipos de sinais (WATANABE & LAM, 2009).

Uma das formas melhor estudadas de morte celular programada é a apoptose, em animais, que apresenta características fisiológicas e morfológicas distintas (WATANABE & LAM, 2009). Os genes que controlam a apoptose podem ser evolutivamente conservados nos metazoários (ARAVIND *et al.*, 2001), entre eles os da subfamília Bax, que induzem a ativação da apoptose. Certas condições ambientais que causam estresses bióticos e abióticos, tais como ataque de patógeno, choque térmico, exposição a ozônio, fitotoxinas ou agentes indutores de estresse oxidativo podem causar, em plantas, mudanças bioquímicas e estruturais características da apoptose (LAM, 2004; GRENNBERG & YAO, 2004). Homólogos de BI-1 foram clonados de *Arabidopsis* e arroz, e tiveram confirmada sua habilidade de resgatar a letalidade Bax-induzida em levedura (KAWAI *et al.*, 1999). Em

seguida, diversos genes relacionados a BI-1, de outras espécies de plantas, foram caracterizados.

Kawai-Yamada e colaboradores (2001) relataram que mesmo na ocorrência de elevados níveis de ROS intracelular pela expressão de Bax, a superexpressão de AtBI-1 em *Arabidopsis* suprimiu extensivamente a morte celular nesta planta. Em alguns casos, o estresse induzido por ROS não foi significativamente alterado em células superexpressando BI-1, embora a superexpressão deste gene em diversas espécies de plantas tenha se mostrado inibidora da morte celular induzida por: patógenos fúngicos, elicitores fúngicos, peróxido de hidrogênio, ácido salicílico, altas temperaturas e baixas temperaturas. Assim, BI-1 deve atuar antes dos primeiros passos da via de morte-celular dependente de ROS (KAWAI-YAMADA *et al.*, 2004 *apud* WATANABE & LAM, 2009).

A sequência do gene BI-1 de *Hordeum vulgare* alinhou com um “contig” (correspondente ao Glyma11g04040) apenas na biblioteca B3. Esse gene teve sua expressão aumentada em soja apenas nos tempos 1h e 6h (Figura 10d). Uma vez que as rotas de resposta do RE ao estresse desempenham papéis importantes em processos biológicos tais como resposta a patógenos, sugeriu-se que BI-1 poderia funcionar para controlar o ponto de convergência que modula o nível de sinais pró-sobrevivência e pró-morte sob essas múltiplas condições de estresse (HÜCKELHOVEN, 2007; WATANABE & LAM, 2009). A superexpressão deste gene nos tempos iniciais pode justificar a ausência de necrose, indicando que a planta seguiu outra rota de defesa independente de morte celular.

Possíveis novos genes encontrados neste estudo

A porcentagem de sequências sem identidade com genes conhecidos pode conter informações úteis para a elucidação dos mecanismos de resistência não-hospedeira, pois podem ser relativas a sequências de proteínas ainda não descritas em soja. A anotação automática caracterizou grande parte das sequências como DNA genômico de soja e, com base nas análises com AutoFact, forneceu evidências de que algumas destas sequências possivelmente codificam proteínas similares a outras descritas em diversos organismos, o que pode nos levar a inferir sobre sua participação em rotas metabólicas envolvidas em resistências não-

hospedeira em soja. Grande parte destas sequências está envolvida em processos de tráfego intracelular de vesículas e fosforilação de proteínas.

Foi encontrada nas três bibliotecas uma sequência correspondente a uma provável Proteína de Ligação a Fator Solúvel Sensível a N-etilmaleimida (alpha-soluble NSF attachment protein – SNAP-alpha). Estas proteínas são necessárias para o transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. Sequências correspondentes a prováveis fosfatases também estão representadas. Inúmeras vias de sinalização celular são reguladas pela fosforilação/desfosforilação de proteínas e a adição/remoção de grupamentos fosfatos, disparados por efetores extracelulares (como os hormônios), pode gerar “motivos” de reconhecimento que permitem a interação proteína-proteína, o controle da atividade celular e principalmente a modulação da atividade de enzimas (AOYAMA *et al.*, 2003).

CONCLUSÃO

Os dados obtidos podem ser relevantes para o entendimento de como as plantas se defendem contra patógenos heterólogos. A validação da expressão dos homólogos de PEN2 e PEN3 em soja é importante inclusive para ajudar a comprovar o modelo de interação proposto para a atuação desses genes.

A grande quantidade de transcritos diferencialmente expressos gerados com este trabalho mostra a necessidade de que mais sequências similares a genes de resistência não-hospedeira sejam selecionadas para validação, e que outras enzimas importantes nas cascatas de transdução de sinais que coordenam as respostas de defesa sejam identificadas. A validação de novos genes, similares a genes descritos em outros organismos, pode nos levar a inferir sua participação em rotas metabólicas envolvidas na resistência não-hospedeira em soja. Estes genes podem vir a ser utilizados em programas de melhoramento, por meio de técnicas de engenharia genética, para obtenção de cultivares com resistência genética efetiva contra a ferrugem asiática da soja.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** v.215, n.3, p.403-10, 1990.
- AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova.** v. 26, n. 6, p.896-900, 2003.
- ARAVIND, L.; DIXIT, V.M.; KOONIN, E.V. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. **Science.** v.29, p.1279-1284, 2001.
- BAKER, C.J. & ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.33, p.299-321, 1995.
- BEDNAREK, P.; PIŚLEWSKA-BEDNAREK, M.; SVATOŠ, A.; SCHNEIDER, B.; DOUBSKÝ, J.; MANSUROVA, M.; HUMPHRY, M.; CONSONNI, C.; PANSTRUGA, R.; SANCHEZ-VALLET, A.; MOLINA, A.; SCHULZE-LEFERT, P. A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. **Science.** v.323, p.101-106, 2009.
- BENNETT, S. Solexa Ltd. Pharmacogenomics, v.5, p.433–438, 2004.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254 - 255, 1980.
- BRUGIERE, S.; KOWALSKI, S.; FERRO, M.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; MIRAS, S.; SALVI, D.; RAVANEL, S.; D'HERIN, P.; GARIN, J.; BOURGUIGNON, J.; JOYARD, J.; ROLLAND, N. The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from *Arabidopsis* cell suspensions. **Phytochemistry** v. 65, p.1693–1707, 2004.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.1367p

CHEONG, J. J.; CHOI, Y. D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants, **Trends in Genetics** v.19, p.409-413, 2003.

CLAY, N. K.; ADIO, A. M.; DENOUX, C.; JANDER, G.; AUSUBEL, F. M. Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. **Science**. v. 323 n. 1, p. 95-101, 2009.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos 2009-2010, quinto levantamento, fevereiro 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2010.

COOPER, G.M. **The Cell: A Molecular Approach**, 2ed. Washington: ASM Press. 2000.

DELESSERT, C.; KAZAN, K.; WILSON, I. W.; VAN DER STRAETEN, D.; MANNERS, J.; DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. **Plant Journal**. v.43, p.745-757, 2005.

DEVOTO, A.; TURNER, J.G. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. **Ann. Bot.** v.92, p.329-337, 2003.

ESTABROOK, E.M. & SENGUPTA-GOPALAN, C. Differential Expression of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone Synthase during Soybean Nodule Development. **The Plant Cell**, v.3, p.299-308, 1991.

FARMER, E. E.; ALMERAS, E.; KRISNAMURTHY, V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Curr. Op. Plant Biol.** v.6, p.372-378, 2003.

FARMER, E.E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell** v.4, p.129-134, 1992.

FEDURCO, M.; ROMIEU, A.; WILLIAMS, S.; LAWRENCE, I.; TURCATTI, G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research*, v.34, n.3, p. e22, 2006.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A.D.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theor Appl Gen**, v.117, p.545-553, 2008.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends Plant Sci**. 7(6):251-6. 2002

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z.; WOOD, K. R. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press. 433p. 1986.

GREENBERG, J. T., YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiol**. v.6, p.201-211, 2004.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**. v.40, p. 347-369, 1989.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense response. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p.1773-1791, 1996.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among 3 genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, p. 237 - 239, 1983.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Plant Biology**, v.3, p.315-319, 2000.

HEATH, M.C. Reaction of nonsusceptors to fungal pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol**. v.18, p.211-236, 1980.

HERNANDEZ, D.; FRANÇOIS, P.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; SCHRENZEL, J. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. **Genome Research**. v.18, p.802-809, 2008.

HONÉE, G. Engineered resistance against fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**. v. 105, p. 319–326, 1999.

HÜCKELHOVEN, R. Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.45, p.101–27, 2007.

HULBERT, S. H.; WEBB, C. A.; SMITH, S. M.; SUN, Q. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.39, p.285–312, 2001.

JENSEN, M. K.; RUNG, J.H.; GREGERSEN, P. L.; GJETTING, T.; FUGLSANG, A. T., HANSEN, M.; JOEHNK, N.; LYNCKJAER, M. F.; COLLINGE, D. B. The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis*. **Plant Mol Biol.** v.65, p.137-150, 2007.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York McGraw-Hill. 1940.

JOHNSON, R. Classical plant breeding for durable resistance to diseases. **Journal of Plant Pathology**. v. 82, n. 1, p. 3-7, 2000.

KANZAKI, H.; SAITOH, H.; ITO, A.; FUJISAWA, S.; KAMOUN, S.; KATOU, S.; H. YOSHIOKA, H.; TERAUCHI, R. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. **Mol Plant Pathology**. v. 4, n. 5, p. 383-391, 2003.

KAWAI, M.; PAN, L.; REED, J.C.; UCHIMIYA, H. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. **FEBS Lett.** v.464, p.143-147, 1999.

KAWAI-YAMADA, M.; JIN, U.; YOSHINAGA, K.; HIRATA, A.; UCHIMIYA, H. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression

of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 (AtBI-1). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.98, p.12295-12300, 2001.

KLEFFMANN, T.; RUSSENBERGER, D.; VON ZYCHLINSKI, A.; CHRISTOPHER, W.; SJOLANDER, K.; GRUISSEM, W.; BAGINSKY, S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. **Curr. Biol.** v.14, p.354–362, 2004.

KOSKI, L. B.; GRAY, M. B.; LANG, B. F.; BURGER, G. AutoFACT: An Automatic Functional Anotation and Classification Tool. **BMC Bioinformatics**, v.6, p.151, 2005.

KREUZALER, F.; RAGG, H.; FAUTZ, E.; KUHN, D. N., and HAHLBROCK, K. UV induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Fetoeselinum hortense*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80,2591 -2593, 1983.

LAM, E. Controlled cell death. plant survival and development. **Nature Reviews in Mol. Cell. Biology**. v. 5, p. 305-315, 2004.

LAPERUTA, L. di C.; ARIAS, C. A. A.; RIBEIRO, A. S.; RACHID, B. F.; PIEROZZI, P. H. B.; TOLEDO, J. F. F de.; PÍPOLO, A. E.; CARNEIRO, G. E. de S. New genes conferring resistance to Asian soybean rust: allelic testing for the Rpp2 and Rpp4 loci. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1741 - 1747, 2008.

LÉON, J., LAWTON, M. A., AND RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiol**. v.108, p.1673-1678, 1995.

LI, R.; LI, Y.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. SOAP: short oligonucleotide alignment program. **Bioinformatics** 24:5:713-714, 2008.

LIPKA, U.; FUCHS, R.; KUHNS, C.; PETUTSCHNIG, E.; LIPKA, V. Live and let die – *Arabidopsis* nonhost resistance to powdery mildews. **European Journal of Cell Biology**. v.89, n. 2-3, p. 194-199, 2010.

LIPKA, V.; DITTGEN, J.; BEDNAREK, P.; BHAT, R.; WIEMER, M.; STEIN, M.; LANDTAG, J.; BRANDT, W.; ROSAHL, S.; SCHEEL, D.; LLORENTE, F.; MOLINA, A.; PARKER, J.; SOMERVILLE, S.; SCHULZE-LEFERT, P. Pre- and post-invasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. **Science**, v.301, p.1180-1183, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**. v. 25, p. 402-408, 2001.

LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; GOELLNEER, K.; CONRATH, U.; SCHAFFRATH, U. Characterisation of nonhost resistance of *Arabidopsis* to the Asian soybean rust. **Mol Plant Microbe Int.** v. 21, p. 1421-1430, 2008.

MAIMBO, M.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; YOSHIOKA, H.; KIBA, A. Induction of a small heat shock protein and its functional roles in *Nicotiana* plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum*. **Plant Physiol.** v. 145, p. 1588-1599, 2007.

MARTINS, E. Proteínas Relacionadas à Patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno – Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. p.115-152. Piracicaba: FEALQ, 2008.

McLEAN, R. J.; BYTH, D. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 951 - 956, 1980.

MILES, M. R.; HARTMAN, G. L.; LEVY, C.; MOREL, W. Current status of soybean rust control by fungicides. **Pesticide Outlook**. v. 14, p. 197-200, 2003.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Plant Science**, n.2, v.9, p.97-104, 2004.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 249–266, 2004

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Mol Plant Pathol**, v.6, p.335-345, 2005.

OH, S. K.; LEE, S.; CHUNG, E.; PARK, J. M.; YU, S. H.; RYU, C. M.; CHOI, D. Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. **Planta**. v.223, p.1101–1107, 2006.

OLIVEROS, J.C. VENNY, An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007. Disponível em <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res.** v. 29, p. 2002-2007, 2001.

SARAVITZ, D.M.; SIEDOW, J.N. The Differential Expression of Wound-Inducible Lipoxygenase Genes in Soybean Leaves. **Plant Physiology**, v.110, p.287-299, 1996.

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**. v. 34, n. 4, p. 1245-1247, 2004.

STEIN, M.; DITTGEN, J.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, C.; HOU, B. H.; MOLINA, A.; SCHULZE-LEFERT, P.; LIPKA, V.; SOMERVILLE, S. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. **The Plant Cell**, v.18, p.731–746, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2009.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Curr Opin Plant Biol**. v. 6, p. 351-357, 2003.

TURCATTI, G.; ROMIEU, A.; FEDURCO, M.; TAIRI, A. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic acids research*, v.36, e25, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** v. 18, n.3, p. 7. RESEARCH0034, 2002.

WATANABE, N.; LAM, E. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. **Int J Mol Sci.** v.10, n.7, p.3149-67, 2009.

WOLF, G.; FRIC, F. A rapid staining method for *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in and on whole barley leaves with a protein specific dye. **Phytopathology.** v. 71, p. 596-598, 1981.

WYNN, W. K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: response to a surface contact stimulus. **Phytopathology.** v. 66, p. 136-146, 1976.

YORINORI, J.T.; NUNES JÚNIOR, J.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: Embrapa Soja. 36p. (Documentos 247), 2004.