

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MICROSCÓPICA DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA MEDIADA PELO GENE *Rpp4*

MOLECULAR AND MICROSCOPIC CHARACTERIZATION OF RESISTANCE TO ASIAN SOYBEAN RUST MEDIATED BY *Rpp4*

MORALES, A.M.A.P.<sup>1</sup>; PEREIRA, A.A.<sup>2</sup>; BRITO JUNIOR, S.L.<sup>3</sup>; ROMERO, C.C.<sup>4</sup>; BORÉM, A.<sup>2</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.<sup>1</sup>; GRAHAM, M.A.<sup>5</sup>; ABDELNOOR, R.V.<sup>4</sup>.

1 Bolsista de Pós-doutorado CAPES/EMBRAPA, Embrapa Soja, Londrina, PR; e-mail: aguidamorales@gmail.com

2 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG;

3 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR;

4 Embrapa Soja, Londrina, PR;

5 ARS-USDA, Corn Insects and Crop Genetics Research, Ames, IA, EUA.

### Resumo

Cinco genes de resistência à ferrugem asiática foram identificados em soja: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*. Para obter maiores informações sobre a função dos genes *Rpp4* candidatos, o presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil microscópico da interação planta patógeno através de análises microscópicas além de analisar o padrão de expressão dos genes *Rpp4* candidatos em diferentes tempos após inoculação através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), durante a interação com o fungo. Entre os períodos de 24, 48, 72, 96, 120 hai, não foi observado nenhuma diferença significativa de expressão entre o material inoculado quando comparado com o falso inoculado. Entretanto nos horários de 308 e 504 horas após a inoculação podemos observar que os genes *Rpp4* candidatos tiveram a expressão induzida em 1,88 e 2,16 vezes quando comparado com o material falso inoculado. Na análise microscópica, *P. pachyrhizi* iniciou o processo de penetração 9 hai, sendo observados pontos de perfuração no tecido foliar próximos às junções celulares. Transcorrida 12 horas da inoculação, foi possível visualizar a formação da hifa primária de infecção. A colonização do mesófilo avançou nas horas subseqüentes, sendo que em 72 hai foi possível observar o mesófilo bem colonizado por hifas septadas de *P. pachyrhizi*. Estes estudos permitiram melhor compreender os mecanismos moleculares no envolvimento da interação entre soja e *P. pachyrhizi*.

### Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das mais importantes culturas do Brasil, alcançando na safra 2010/2011 valores da ordem de 75 milhões de toneladas. Entretanto, um considerado número de fatores bióticos e abióticos afetam a produção de soja. A ferrugem asiática da soja (FAS) é uma doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, um fungo patogênico que tem como hospedeiros mais de 42 gêneros de plantas.

Práticas efetivas são necessárias para o controle da ferrugem asiática da soja. O principal método de controle utilizado é a aplicação de fungicidas, o que aumenta substancialmente o custo de produção e são prejudiciais ao meio ambiente. A prevenção ainda é a melhor maneira de evitar mais perdas significativas na produção de soja. O uso de variedades resistentes e/ou tolerantes é o método mais promissor para o controle da doença.

Recentemente, foram descritos e mapeados cinco genes de resistência em soja *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5*. Estudos relatam que o gene *Rpp4* é o gene mais estável quando testado contra isolados de diferentes partes do mundo. O *Rpp4* foi mapeado no cromossomo 18 e o sequenciamento desta região no genótipo suscetível Williams 82 (Wm82) identificou um cluster com três genes de resistência (CC-NBS-LRR). Os marcadores (SSRs) desenvolvidos no genótipo Wm82 e polimórficos no genótipo resistente PI459025B foi avaliados contra a mesma

população segregante usada originalmente no mapeamento do *Rpp4*. Estes marcadores mapearam o *Rpp4* no meio de um cluster de genes de resistência na PI459024B (GOELLNER et al., 2010).

Recentemente, foi sequenciado uma região de >607Kb do locus *Rpp4* no parental resistente PI459025B onde identificou-se 10 genes *Rpp4* candidatos (CC-NBS-LRR). Com a finalidade de identificar o(s) gene(s) correspondente(s) ao *Rpp4* analisou-se a expressão dos genes candidatos em diferentes tecidos da soja após a inoculação, onde se pode observar a expressão diferencial dos genes *Rpp4* candidatos em todos os tecidos quando inoculado com o fungo. Em flores e sementes, o *Rpp4* teve a expressão reduzida quando inoculado com *P. pachyrhizi*. Já, em folhas, a expressão teve um aumento de 1.35 vezes com a inoculação (MORALES, 2011).

Sabe-se que compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de defesa é de primordial importância no planejamento de estratégias para o controle do estresse e, conseqüentemente, para aumentar a adaptação das plantas a condições limitante.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a expressão dos genes *Rpp4* candidatos em folha em diferentes horas após a inoculação e caracterizar a interação estabelecida entre o patossistema soja x *P. pachyrhizi* através de análises microscópicas.

## **Material e Métodos**

### **Experimento 1 - Análise da expressão dos genes *Rpp4* candidatos em folha de soja**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Soja, Londrina, PR. Sementes do genótipo PI459025B (resistente à ferrugem) foram semeadas em vasos individuais contendo três plantas por vaso. O experimento foi conduzido sob uma temperatura diurna de 25 a 28°C e uma temperatura noturna de 20 a 22° C, 90% ± 2% de umidade relativa e 12 h de luz. As plantas foram inoculadas 25 dias após a semeadura. Para tanto, uma população de uredósporos de *P. pachyrhizi* foram obtidos a partir de plantas de soja suscetíveis ao fungo (Embrapa 48) previamente inoculadas, mantidas em casa de vegetação separada, na Embrapa Soja. Os esporos coletados foram utilizados no preparo da suspensão feita com água esterilizada contendo 0,01% de Tween20 (v/v) e diluídos a concentração final de  $18,5 \times 10^4$  esporos/ml. Uma solução de água destilada contendo 0,01% de Tween20 (v/v) foi utilizada para a inoculação das plantas falso-inoculadas. Após a inoculação, as plantas foram recobertas com saco plástico, permanecendo por 24 h, para fornecer condições ideais para o processo de infecção, além de evitar contaminação cruzada entre os materiais inoculados e falso-inoculados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento (inoculado e falso-inoculado) O terceiro trifólio de cada planta foi coletado com 24, 48, 72, 96, 120, 308, 504 horas após a infecção (hai) e armazenados em -80°C até o momento da extração de RNA. A extração de RNA total foi feita com o reagente trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. O RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR( Invitrogen). A reação de RT-qPCR foi feita utilizando o Kit Platinum SYBR GREEN qPCR Supermix-UDB with Rox (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante e o equipamento 7300 Real time PCR System (Applied Biosystems). Para o cálculo da eficiência de cada reação foi realizada a quantificação absoluta pelo método de curva padrão a partir das diluições seriadas da amostra de cDNA([ ], 10x, 100x, 1000x). A quantificação relativa foi feita utilizando as mesmas condições de amplificação que a curva padrão. Controle negativos utilizando água foram usados em todas as reações para verificar a presença de possíveis contaminações. Utilizou-se o gene constitutivo Gm $\beta$ -actina como referência endógena e como calibrador foram utilizadas as amostras falso inoculadas. As análises de expressão foram calculadas pelo programa REST 2009.

### **Experimento 2 - Inoculação de uredósporos de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas e análises citológicas**

Para visualizar o processo de infecção de *P. pachyrhizi*, folhas de soja, crescidas em casa de vegetação sob as mesmas condições descritas anteriormente, foram destacadas e inoculadas com suspensão contendo uredósporos de *P. pachyrhizi* ( $8,4 \times 10^4$  esporos/mL), conforme procedimento descrito por Magnani et al. (2007). Após a inoculação, fragmentos foliares foram coletados 9, 12, e 72 hai, fixados em FAA 50% e mantidos a 4°C por pelo menos 48 horas. Os segmentos foliares coletados foram clareados em etanol:clorofórmio (3:1 v/v) contendo uma mistura de 0,15% de ácido tricloroacético (TCA) (Wolf & Fric, 1981). Para a visualização de hifas no interior do mesófilo, foi utilizado clareamento conforme descrito por Brito Júnior et al. (comunicação pessoal, 2011) e as imagens foram visualizadas em microscópio ótico Olympus BX50 acoplado com lentes de contraste de fase. Todas as imagens foram obtidas com câmera Moticam 2300 3.0MP *Live Resolution*.

## Resultado e Discussão

A análise de curva padrão revelou uma eficiência de amplificação de 94% e 96% para os genes *Rpp4* e Gm $\beta$ -actina, respectivamente. O potencial uso do gene Gm $\beta$ -actina como referência endógena foi previamente sugerido por Stolf-Moreira et al. (2011).

Meyers et al. (2009) observaram que os genes *Rpp4* candidatos tiveram a expressão induzida em folhas do parental resistente PI459025B inoculadas com o fungo quando comparadas com o genótipo suscetível Williams 82. Entretanto nenhuma diferença significativa na expressão do gene foi encontrada entre tecidos inoculados e falso inoculados.

Em trabalho preliminar, Morales, (2011) analisou a expressão dos genes presente no locus do *Rpp4* e observou que os genes *Rpp4* candidatos foram induzidos apenas em folhas de soja inoculadas quando comparadas com material falso inoculado. No presente trabalho também observamos uma expressão diferencial dos genes *Rpp4* candidatos em diferentes tempos após a inoculação com o fungo em folhas. Entre os períodos de 24, 48, 72, 96, 120 hai, não foi observado nenhuma diferença significativa de expressão entre o material inoculado quando comparado com o falso inoculado Entretanto nos horários de 308 e 504 horas após a inoculação podemos observar que os genes *Rpp4* candidatos tiveram a expressão induzida em 1,88 e 2,16 vezes quando comparado com o material falso inoculado.

Nossos resultados foram similares aos obtidos por Meyers et al. (2009), que analisaram através da técnica de RT-qPCR os níveis de expressão dos genes *Rpp4C1* ao *Rpp4C3* no genótipo suscetível (Wm82) e *Rpp4C1* ao *Rpp4C5* no genótipo resistente (PI459025B). Genes de resistência candidatos foram relatados como sendo expressos constitutivamente em baixo nível antes da infecção com o patógeno.

Os resultados obtidos para os genes *Rpp4* candidatos mostram uma resposta bifásica de expressão com as fases de infecção do fungo. A primeira resposta de expressão gênica em 12 hai foi observada por Morales (2011) e estaria relacionada com a formação do apressório e penetração das células epidérmicas, enquanto que a segunda fase, a expressão dos genes *Rpp4* candidatos seria novamente induzida a partir de 308 e 504 hai. Resultados semelhantes foram identificados em plantas de soja que continha o gene *Rpp3* onde observaram também uma expressão bifásica (Schneider et al., 2011).

Van de Mortel et al. (2007) detectaram também mudanças bifásicas na expressão gênica, com um pico de expressão de genes relacionados à defesa dentro das primeiras 12 horas após a infecção em ambos os genótipos, e outro próximo de 72 horas após infecção no genótipo resistente e próximo de 96 horas após infecção no genótipo suscetível, indicando uma expressão gênica relativamente mais precoce nos mecanismos mediados pelo *Rpp2*.

Na análise microscópica, *P. pachyrhizi* iniciou o processo de penetração 9 hai, sendo observados pontos de perfuração no tecido foliar próximos às junções celulares. Transcorrida 12 horas da inoculação, foi possível visualizar a formação da hifa primária de infecção. A colonização do mesófilo avançou nas horas subsequentes, sendo que em 72 hai foi possível observar o mesófilo bem colonizado por hifas septadas de *P. pachyrhizi*. Há estudos que mostram que a germinação bem como a formação do apressório em *P. pachyrhizi* apresentam resposta tigmotrópica (Loehrer et al., 2008). Isso pode ser observado pela preferência na formação do apressório junto às paredes anticlinais de células adjacentes.

### Conclusões

Os genes *Rpp4* candidatos apresentaram expressão diferencial em folhas de soja inoculadas quando comparadas com material falso inoculado. Da mesma forma como já descrito para os genes *Rpp2* e *Rpp3*, os genes *Rpp4* candidatos apresentaram um perfil de expressão bifásica.

O fungo *P. pachyrhizi* foi eficiente em penetrar e colonizar o tecido vegetal do genótipo resistente PI459025B, porém, nossas análises não foram suficientes para observar a formação do haustório.

### Referências

GOELLNER, K.; LOEHRER, L.C.; CONRATH, U.; AKOCH, E.C.; SCHAFFRAT, H.U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v.2, p.169-177, 2010.

LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; GOELLNER, K.; CONRATH, U.; SCHAFFRATH, U. Characterization of nonhost resistance of Arabidopsis to the asian soybean rust. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.21, p.1421-1430, 2008.

MAGNANI, E.B.Z.; ALVES, E.; ARAÚJO, D.V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.156-160, 2007.

MEYER, J.D.F.; SILVA, D.C.G.; YANG, C.; PEDLEY, K.F.; ZHANG, C.; VAN DE MORTEL, M.; HILL, J.H.; SHOEMAKER, R.C.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A.; GRAHAM, M.A. Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in Soybean. **Plant Physiology**, v.150, p.295-307, 2009.

MORALES, A.M.A.P.; GRAHAM, M.; BOREM, A.; ABDELNOOR, R.V. Advances on molecular studies of the interaction soybean - Asian rust. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2012. No prelo.

MORALES, A.M.A.P. **Caracterização molecular da resistência à ferrugem asiática da soja mediada pelo gene *Rpp4***. 2011. 70f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SCHNEIDER, K.T.; VAN DE MORTEL, M.; BANCROFT, T.J.; BRAUN, E.; NETTLETON, D.; NELSON, R.T.; FREDERICK, R.D.; BAUM, T.J.; GRAHAM, M.A.; WHITHAM, S.A. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlates with fungal penetration and haustoria formation. **Plant Physiology**, v.157, p.335-371, 2011.

STOLF-MOREIRA, R.; LEMOS, E.G.M.; ABDELNOOR, R.V.; BENEVENTI, M.A.; ROLLA, A.A.P.; PEREIRA, S.S.; OLIVEIRA, M.C.N.; NEPOMUCENO, A.L.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.58-65, 2011.

VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J.C.; GRAHAM, M.A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J.D.; NELSON, R.T.; GODOY, C.V.; ABDELNOOR, R.V.; ALMEIDA, A.M.R.; BAUM, T.J.; WHITHAM, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, p.887-899, 2007.

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.