

SALVADOR LIMA BRITO JÚNIOR

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDA POR
***Phakopsora pachyrhizi* EM SOJA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

SALVADOR LIMA BRITO JÚNIOR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA INDUZIDA POR
Phakopsora pachyrhizi EM SOJA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2007.

Dra. Francismar Corrêa Marcelino
(Co-orientadora)

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Múcio Silva Reis

Prof. Ney Sussumu Sakiyama

Prof. Aluízio Borém de Oliveira
(Orientador)

DEDICO

Aos meus pais,
Salvador Lima Brito e Ises da
Aparecida Nunes Brito, e ao
meu irmão, Guilherme
Emanuell Nunes Lima Brito

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Salvador Lima Brito e Ises Aparecida Nunes Brito, razão maior da minha existência, e espelho para a minha conduta. Obrigado por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado nas minhas decisões.

Ao meu irmão Guilherme por sempre me proporcionar momentos de alegrias. Obrigado pelo seu companheirismo Gui.

Ao meu orientador Dr. Aluizio Borém, pelos seus ensinamentos, competência, e acima de tudo pela sua amizade.

Aos meus co-orientadores Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor e Dra. Francismar Corrêa Marcelino, pelo incentivo, credibilidade e confiança. Seus ensinamentos e amizade serão por toda vida.

Ao Dr. Ney Sussumu Sakyama, Dr. Múcio Silva Reis e Dr.^a Eveline Teixeira Caixeta, pela participação na banca de defesa da dissertação.

Aos funcionários do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa-Soja, Silvana Rockenback, César Silveira, Vera Pierotti (Verinha), Nilson Vieira, Jairo, que diretamente participaram da realização deste trabalho. Agradeço o carinho e amizade de todos vocês.

Aos pesquisadores Dr. Alexandre Nepomuceno, Dr. Álvaro Almeida, Dr. Eliseu Binneck e Dr. Naoki Yamanaka, por toda ajuda, sempre disponibilizada.

Aos meus amigos Renata Stolf, Danielle Gregorio, Noelle Giacomini, Adriana Polizel, Aguida Morales, Alan Pereira, Lizandra Catelli, Magda Beneventi, Renata Fuganti, André Passionoto, João Maldonado, André Paulo, Maria Thereza, Maria Cecília, Paula Camargo, Selma Pereira, Amanda Paiva, Luana Gonçalves e Rodrigo Pereira, meus

sinceros agradecimentos por tudo; pelos bons e divertidos momentos que passamos no laboratório. Tenho um carinho muito grande por vocês.

À minha namorada Lívia, pela sua amizade, companheirismo, carinho e dedicação. Por sempre proporcionar momentos ímpares na minha vida e me dar forças para seguir em frente.

Aos meus amigos Leonardo Ribeirinho e Isabele Bruna Barbieri pela grande amizade e por terem me acolhido em Londrina - PR.

Aos meus amigos da pós-graduação em Genética da UFV, em especial à Maíra Cristina Menezes Freire, Samuel Mazzinhy e Ramon Almeida, pela grande amizade. Obrigado pelo incentivo e torcida pelo meu sucesso.

Aos meus familiares que sempre acreditaram no meu potencial.

Aos meus amigos Hubsclender, Sarah, Ighor e Camilah Zappes, Wilson Cardoso, Mauredson Vieira e Arilson Ribeiro que de perto, acompanharam essa trajetória. Obrigado por tudo.

À Embrapa-Soja por ter me proporcionado um aperfeiçoamento profissional, tornando possível a realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade oferecida para realização deste curso.

À Capes pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

SALVADOR LIMA BRITO JÚNIOR, filho de Salvador Lima Brito e Ises da Aparecida Nunes Brito, nasceu na cidade de Governador Valadares, MG, em 15 de março de 1982.

Ingressou no curso de Bacharel em Ciências Biológicas, na Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE em 2001, concluindo a graduação em 2004.

Em agosto de 2005 iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – A Soja	3
2.1.1 – A Soja no Mundo	3
2.1.2 – A Soja no Brasil	4
2.1.3 – A Soja na Economia Brasileira	6
2.2 – Ferrugem Asiática da Soja	7
2.2.1 – Dados Econômicos da Ferrugem Asiática no Brasil	9
2.2.2 – Aspectos Epidemiológicos da Ferrugem Asiática	10
2.2.3 – Métodos de Controle	13
2.3 – Mecanismos de Resistência a Doenças em Plantas	14
3 – OBJETIVO GERAL	19
3.1 – Objetivos Específicos	19
4 – MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 – Seleção dos Genes	20
4.2 – Construção dos Oligonucleotídeos	20
4.3 – Material Biológico	21
4.4 – Delineamento Experimental	22
4.5 – Inoculação do Patógeno	23
4.6 – Coleta do Material	24
4.7 – Extração do RNA	25
4.8 – Síntese do cDNA	26
4.9 – PCR Qualitativo	27

4.10 – PCR em Tempo Real	28
4.11 – Análise Estatística	30
5 – RESULTADO	31
5.1 – Seleção dos Genes para Análise da Expressão Gênica	31
5.2 – Acesso dos Genes no GenBank.....	32
5.3 – Construção dos Oligonucleotídeos.....	33
5.4 – Teste de Amplificação dos Oligonucleotídeos	36
5.5 – Quantificação Relativa dos Genes Envolvidos na Resposta de Resistência	39
6 - DISCUSSÃO	43
6.1 – Genes selecionados para a análise da quantificação relativa por PCR em tempo real, em soja, após inoculação do patógeno <i>P. pachyrhizi</i>	43
6.2 – Quantificação relativa dos genes envolvidos no mecanismo de defesa da soja frente a <i>P. pachyrhizi</i>	45
7 – CONCLUSÃO.....	54
8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
9 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	57

RESUMO

BRITO JÚNIOR, Salvador Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Análise da expressão gênica induzida por *Phakopsora pachyrhizi* em soja.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Orientadores: Ricardo Vilela Abdelnoor e Francismar Corrêa Marcelino.

Ferrugem asiática da soja, uma doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tem provocado sérios danos econômicos à sojicultura brasileira e mundial. A obtenção de linhagens de soja resistentes ao fungo tem sido um desafio, e atualmente as medidas de controle da doença são baseadas no manejo da cultura e aplicação de fungicidas. Com o objetivo de avançar o conhecimento sobre o mecanismo molecular de defesa da planta frente a ferrugem asiática da soja, avaliou-se, através da técnica de PCR em tempo real, a expressão de genes que supostamente estão envolvidos no mecanismo de defesa. Dois genótipos foram selecionados para a condução do experimento, PI 230970, que possui o alelo *Rpp2* e desenvolve lesões do tipo RB, quando em presença de *P. pachyrhizi*, e Embrapa-48, suscetível, desenvolvendo lesões tipo TAN. O experimento foi conduzido em sala climatizada (Fitotron) e para a análise de expressão gênica foram extraídos RNAs de folhas da soja inoculadas com o patógeno e falso-inoculadas (água). Dentre os genes avaliados, quitinase apresentou uma expressão 117 vezes maior no genótipo resistente (PI 230970), quando comparado com o calibrador (PI 230970 falso-inoculado), atuando possivelmente como

uma barreira de defesa da planta. No genótipo suscetível a expressão deste gene foi 1,75 vezes maior que o seu calibrador (Embrapa-48 falso-inoculado). Foi observada uma expressão diferencial de genes relacionados a espécies reativas de oxigênio, produção de fitoalexinas bem como genes envolvidos na liberação de elicitores. Esses genes podem estar atuando no mecanismo de defesa contra *P. pachyrhizi* no genótipo resistente, porém sua expressão também no genótipo suscetível pode estar relacionado a uma maior colonização do patógeno no tecido hospedeiro ou uma resposta tardia à infecção. A identificação de uma rota de defesa pode possibilitar o estudo mais aprofundado da mesma, com o objetivo de identificar genes mais específicos no processo de defesa celular e apontar novas alternativas para obtenção de cultivares resistente.

ABSTRACT

BRITO JÚNIOR, Salvador Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2007. **Analysis of gene expression induced for *Phakopsora pachyrhizi* in soybean.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-advisers: Ricardo Vilela Abdelnoor and Francismar Corrêa Marcelino.

Soybean Asian Rust, a disease caused by the fungi *Phakopsora pachyrhizi*, has caused serious economic damages to the Brazilian and world-wide soybean crop. The development of soybean lines resistant to this fungi has been a challenge, and currently the measures of control this disease are based on the handling of the crop and application of fungicides. With the objective to advance the knowledge on the molecular mechanism of defense of the plant to the Soybean Asian Rust, it was evaluated, by PCR in real time, the expression of genes that supposedly are involved in the defense mechanism. Two genotypes had been selected for the conduction of the experiment, PI 230970, that it possess allele *Rpp2* and develops type RB type injuries, when in presence of *P. pachyrhizi*, and Embrapa-48, susceptible, which develops injuries of Tan type. The experiment was carried out in Fitotron and for the analysis of the gene expression was done using RNAs from leaves of the soybean inoculated either with pathogen or mock-inoculated with water. Amongst the evaluated genes, chitinase presented an expression 117 times higher in the resistant genotype (PI 230970), when compared with the calibrator (PI 230970 mock-inoculated) possibly acting as a barrier of defense of the plant. In the susceptible genotype the expression of this gene was 1.75

time higher than your calibrator (Embrapa-48 mock-inoculated). It was observed a differential expression of related genes with reactive species oxygen, production of phytoalexins as well as involved genes in the release of elicitors. These genes can be acting in the mechanism of defense against *P. pachyrhizi* in the resistant genotype; however its expression in the susceptible genotype can be related to a bigger settling of the pathogens in the tissues of the host or to a delayed response to the infection. The identification of a defense route should be further investigated, with the objective to identify more specific genes in the process of cellular defense and to point out new alternatives for the development of resistant cultivars.

1 – INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, tem causado inúmeros danos a sojicultura brasileira e mundial.

Desde a sua constatação no território brasileiro no ano de 2001, no Estado do Paraná, a doença espalhou-se rapidamente pelo Brasil (YORINORI, 2004). Na safra 2001/2002 se apresentava por toda a região Sul e parte do Centro-Oeste. Já na safra 2002/2003 atingia 90% da área de soja do Brasil (YORINORI, 2005). A única região brasileira com plantio de soja, onde ainda não foi constada a ocorrência da ferrugem asiática é Roraima – RR (EMBRAPA-SOJA, 2006a).

Somados os custos na produção, aplicações de fungicidas, perda na produtividade entre outros, os danos econômicos ao Brasil já ultrapassam a soma de sete bilhões de dólares, desde a constatação da ferrugem asiática em 2001. Isso demonstra a importância dos investimentos em pesquisas, para que melhores estratégias sejam elaboradas e medidas eficientes sejam executadas no intuito de minimizar os danos causados pela ferrugem.

Quando atacada pelo fungo da ferrugem, as plantas de soja respondem por meio de complexos mecanismos que resultam em interações compatíveis ou incompatíveis com o patógeno. PASCHOLATI & LEITE (1995) argumentaram que a interação hospedeiro-patógeno pode ser vista como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência, onde o hospedeiro, por meio de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno. Ainda segundo os mesmos autores, a

tentativa de infecção dos tecidos de uma planta por um patógeno inicia uma progressão complexa de interações biológicas e moleculares, que culmina nos sintomas visuais associados com resistência (interação incompatível) ou suscetibilidade (interação compatível).

Quando submetida ao ataque de um patógeno, a planta desenvolve um processo de reconhecimento e defesa. A produção de compostos antimicrobianos, ativação do processo de morte celular (reação de hipersensibilidade), indução de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), aumento na expressão de genes de defesa, bem como a produção de compostos oxidativos, são alguns exemplos dos mecanismos da planta em resposta à presença do patógeno (KITAJIMA & SATO, 1999, MYSORE & RYU, 2004). Esses mecanismos de defesa são desencadeados pela expressão de vários genes envolvidos em várias fases do processo de infecção. Muitos genes já tiveram o seu papel molecular correlacionado com defesa da planta (KITAJIMA & SATO, 1999; THEVISSSEN, TERRAS & BROEKAERT, 1999; KIRIK et al., 2001; GLAZEBROOK, 2001).

Considerando a importância em avançar o conhecimento sobre o mecanismo molecular de defesa da soja frente ao fungo *P. pachyrhizi*, o estudo de genes relacionados ao mesmo, torna-se importante. O objetivo é o entendimento dos processos moleculares que levam a resistência a essa doença bem como no desenvolvimento de métodos eficientes de controle do fungo e no estudo da reação da soja a outros patógenos.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – A Soja

2.1.1 – A Soja no Mundo

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma espécie autógama pertencente à família das *Fabáceas*, subfamília das *Papilionáceas* e ao gênero *Glycine* L. (GOMES, 1988, CARVALHO FILHO & AMABILE, 1996; WIKIPEDIA, 2007). Apresenta-se como um organismo diplóide ($2n=40$), derivado de um ancestral alotetraplóide, o que explica as altas taxas de duplicação de seu genoma (SHOEMAKER et al., 1996).

Muitos autores relatam que a espécie teria surgido no continente asiático (HYMOWITZ, 1970; BONETTI, 1981; BERTRAND, LAURENT & LECLERCQ, 1987). Como relatam MORAES et al. (1996), é provável que entre o ano 200 a.C e o século III d.C, a soja tenha sido introduzida na Coreia, migrando posteriormente para o Japão. Durante séculos, o cultivo permaneceu restrito apenas aos países orientais, principalmente para a produção de grãos usados na preparação de grande variedade de alimentos. Com a chegada dos europeus no final do século XV e começo do XVI, a soja foi introduzida no Ocidente (BONETTI, 1981).

O botânico alemão Engelbert Kaempher (1651-1716) introduziu a soja na Europa em 1712, quando a trouxe do Japão. Em 1753, Linnaeus foi o primeiro a descrevê-la cientificamente, em sua obra intitulada *Species Plantarum*. Sob as Regras da Nomenclatura Botânica Internacional, a soja é cientificamente chamada *Glycine max* (BONETTI, 1981; MORAES et al., 1996).

Em 1739, missionários na China enviaram sementes de soja para França, onde foi plantada no Jardim “des Plantes”, em Paris. No ano de 1790, a soja foi plantada nos Jardins Botânicos Reais de Kew, um dos mais extensos, antigos e prestigiosos jardins botânicos do mundo localizados na cidade de Londres, Inglaterra (BONETTI, 1981). Assim, a soja foi se disseminando pelo continente Europeu.

A primeira menção da cultura de soja no continente americano data de 1804, no Estado da Pensilvânia. A partir de 1880, a soja adquiriu importância nos Estados Unidos como cultura forrageira. No ano de 1898, o Departamento de Agricultura de Washington estimulou seu cultivo, distribuindo grande número de variedades (MORAES et al., 1996). Devido a sua alta capacidade de rendimento e menor custo de produção, comparada com outras leguminosas, a soja ganhou importância no mercado norte-americano, que em uma política governamental de restrição à produção de milho e algodão, iniciada em 1934, teve um efeito na expansão da área de produção de soja nos Estados Unidos.

2.1.2 – A Soja no Brasil

Concomitante à expansão da sojicultura norte-americana, tem-se os primeiros registros de soja no Brasil. Por intermédio do engenheiro agrônomo Gustavo D’Utra, germoplasma proveniente dos Estados Unidos foi introduzido no Estado da Bahia no ano de 1882, não apresentando, porém uma adaptação às condições locais (BONETTI, 1981; MORAES et al., 1996).

No ano de 1908, através de imigrantes japoneses que se estabeleceram no Estado de São Paulo, a cultura da soja, de fato, foi introduzida no Brasil, disseminando-se por outros Estados, como Rio Grande do Sul, onde encontrou condições favoráveis para o seu desenvolvimento (BONATO & BONATO, 1987).

Somente na década de 1940 o Brasil iniciou as produções comerciais de soja, aumentando gradativamente a sua área plantada e produtividade. Na década de 1960, o Estado do Rio Grande do Sul apresentava 70% da área plantada de soja no país. O estado do Paraná também se destacou a partir desse período, onde a produção de soja passou de 8,5% em 1965 para 42% em 1976 (COSTA, 1996).

Com o avanço de novas fronteiras, a produção de soja ganhou o Brasil Central, no Cerrado, passando a ser a região mais importante para o plantio desta cultura. O desenvolvimento de cultivares bem adaptados, incentivos fiscais, aumento na demanda de soja como uma fonte de proteína, valorização no mercado internacional, estabelecimento de parques industriais, fornecimento de tecnologia e a construção de Brasília no centro do Cerrado, fornecendo uma infra-estrutura e facilitando o acesso à comunicação, entre outros fatores (DALL'AGNOL, 2004), fizeram com que a produção de soja no Cerrado passasse de 2% do total brasileiro em 1970, para mais de 40% em 1990.

Atualmente, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os cinco maiores estados produtores de soja são: Mato Grosso, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007a).

2.1.3 – A Soja na Economia Brasileira

A soja destaca-se como o maior produto de exportação do agronegócio brasileiro. Em quatro décadas (1960 a 2000), a produção de soja no Brasil aumentou 260 vezes, determinando uma transformação positiva na economia brasileira. A produção e competitividade da soja brasileira foram associadas aos avanços científicos e melhorias na tecnologia de produção (DALL`AGNOL, 2004).

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial do grão, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Em 2005, a produção mundial de grãos de soja foi de 214,3 milhões de toneladas, sendo a produção dos Estados Unidos de 83,9 milhões de toneladas, e a do Brasil de 52,7 milhões de toneladas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007b).

Os principais componentes da semente ou grãos de soja, responsáveis por seu valor econômico, são o óleo e a proteína, sendo o óleo de soja o mais consumido no mundo (COSTA, 1996).

Nos últimos três anos (2004 a 2006) as exportações brasileiras de grãos de soja cresceram aproximadamente 31%, totalizando 24.957.973 toneladas, em 2006. A China tem se destacado como o maior importador

de grãos de soja do Brasil. No último ano (2006), 44% das exportações brasileiras de grãos de soja foram destinadas à China (CONAB, 2007a).

Até o momento, em último levantamento sobre a produção de grãos de soja no Brasil para a safra 2006/2007, a área cultivada representou 20,7 milhões de hectares, apresentando uma redução de 6,9% em relação à safra 2005/2006. No entanto essa redução não afetou a produção brasileira, onde as boas condições climáticas favoreceram as lavouras elevando a produtividade de 53,4 milhões de toneladas para 58 milhões de toneladas, um aumento de 8,5% em relação à safra anterior (IBGE, 2007).

A região Centro-Oeste destaca-se com 45,9% da produção, seguida pela região Sul (38,2%), Sudeste (7,0%), Nordeste (6,8%) e Norte, com 2,1% (CONAB, 2007b).

2.2 - Ferrugem Asiática da Soja

A ferrugem da soja pode ser causada por duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora*; *Phakopsora meibomia* (Arthur) Arthur e *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. A primeira é conhecida como a ferrugem americana e raramente causa danos econômicos. A segunda, conhecida como a ferrugem asiática, consiste em uma das doenças de maior impacto econômico na cultura da soja (BROMFIELD, 1982; ZAMBENEDETTI, 2005).

A primeira menção da ferrugem asiática da soja data de 1903, no Japão (ONO, BURITICÁ & HENNEN, 1992), avançando, já na década de 1910, para vários países do sudoeste asiático. Até o início do século XXI, a presença da ferrugem asiática não havia sido constatada na América do Sul (HENNING & GODOY, 2006).

Em fevereiro de 1979, DESLANDES (1979) identificou, em área experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, em Lavras - MG, sintomas de ferrugem das folhas em soja, que inicialmente classificou como uma nova doença em soja perene. Com base no hospedeiro, Deslandes mencionou tratar-se de *P. pachyrhizi* o agente causador das lesões. No entanto, o fungo presente era o causador da ferrugem americana – *P. meibomiae* (CARVALHO JÚNIOR & FIGUEIREDO, 2000).

O primeiro relato da ferrugem asiática na América do Sul aconteceu em 2001, afetando lavouras no Paraguai e atingindo o sul do Brasil, no Estado do Paraná. Já na safra 2001/2002, a ferrugem foi identificada em lavouras nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso, ocasionando perdas de mais de 50% na produção de soja no país (HENNING & GODOY, 2006).

Até o momento, o único estado brasileiro produtor de soja, em que não foi constatada a ferrugem asiática, é o Estado de Roraima (EMBRAPA-SOJA, 2007a).

2.2.1 - Dados Econômicos da Ferrugem Asiática no Brasil

Desde a sua constatação no território brasileiro, a ferrugem asiática da soja tem causado sérios danos à economia, com a elevação do custo de produção e redução da produtividade.

Por se tratar de uma doença nova no Brasil, os produtores não estavam preparados para um eficiente controle do patógeno, o que fez com que as medidas tomadas na safra 2001/2002 não fossem muito eficazes no controle à ferrugem. Nessa safra as perdas de produção, em grãos/tonelada, foram na ordem de 569,2 mil, estimando um prejuízo de US\$125,5 milhões.

Na safra de 2002/2003 a ferrugem asiática foi constatada em praticamente todas as regiões produtoras de soja, exceto Roraima e Pará. As perdas econômicas ultrapassaram US\$ 1,1 bilhão.

Avançando ainda mais na área produtora de soja no Brasil, na safra 2003/2004, o único Estado onde não se constatou a presença do patógeno foi Roraima. Aliado às perdas na produção de grãos e custos de produtos e aplicações para o controle da doença, os danos econômicos foram estimados em US\$ 2,08 bilhões.

Na safra 2004/2005, a doença foi relatada praticamente em todas as regiões produtoras, mas somente em Mato Grosso registrou-se perdas. Segundo dados da CONAB, as perdas ocasionadas pela ferrugem foram compensadas provavelmente pelo aumento da área plantada, bem como medidas de controle como a aplicação de fungicidas.

A safra de 2005/2006 registrou uma perda econômica de US\$ 2, 124 bilhões onde em todos os Estados produtores de soja no Brasil, com exceção de Roraima, foi constatada a ferrugem asiática (EMBRAPA-SOJA, 2007b).

As perdas em grãos de soja devido a ferrugem asiática, na safra 2006/2007, foram de aproximadamente 4,5%, o que equivale a 2,67 milhões de toneladas de grãos. O custo total da ferrugem nesta safra foi de 2,19 bilhões (EMBRAPA-SOJA, 2007c).

Um fato interessante a ser mencionado é que em 2004 foi instituído o Consórcio Anti-Ferrugem, que tem o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como coordenador, e vários segmentos da cadeia produtiva da soja como atores. Entre eles estão: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), fundações de apoio à pesquisa, empresas estaduais de pesquisa, de transferência de tecnologias, cooperativas, universidades, a Associação Nacional de Defesa Vegetal (Andef) e a Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos (AENDA). O objetivo do Consórcio Anti-Ferrugem tem sido propor soluções para a identificação, o manejo e, principalmente, o controle da ferrugem asiática.

2.2.2 - Aspectos Epidemiológicos da Ferrugem Asiática

A ferrugem asiática da soja é causada por fungo biotrófico, portanto, dependente de células vivas do hospedeiro.

A infecção por *P. pachyrhizi* causa rápido amarelecimento, bronzeamento ou crestamento (queimaduras) e queda prematura das folhas, impedindo a plena formação dos grãos (YORINORI, NUNES JUNIOR & LAZZAROTTO, 2004). COSTAMILAN, BERTAGNOLLI & YORINORI, em 2002, avaliando a redução de rendimentos de grãos de soja causados pela ferrugem, constataram que o principal efeito no rendimento causado pela doença foi a diminuição do tamanho de grãos resultantes de desfolha precoce.

Em Taiwan, foram registradas perdas de 70-80% na produção de soja, em função da ferrugem asiática. Dados semelhantes ocorreram em Zimbábue, aonde as perdas também chegaram a 80% (LEVY, 2004). No Brasil, os danos causados pela ferrugem asiática, em média, variam de 30 a 70% (ZAMBOLIM, 2006).

Adaptada a uma variação de temperatura entre 7 e 28 °C, *P. pachyrhizi* apresenta uma faixa ótima entre 15 e 25 °C para a germinação (ALVES, FURTADO & BERGAMIN FILHO, 2006). KOCHMAN (1979), avaliando o efeito da temperatura no desenvolvimento da ferrugem asiática, verificou que a faixa de temperatura entre 17 e 27 °C apresentou-se como a melhor condição para o desenvolvimento da ferrugem, ao passo que temperaturas superiores a 28,5 °C comprometeram o desenvolvimento do fungo. BONDE et al. (2006) avaliaram o efeito da temperatura na germinação dos esporos e do tubo germinativo de seis isolados de *P. pachyrhizi*, provenientes de Taiwan, Zimbábue, Havaí, Brasil e dois isolados dos Estados Unidos. Os autores

constataram que todos apresentaram temperatura ótima de germinação entre 17 e 28 °C, sendo a ideal entre 20 e 22 °C.

Concomitante à temperatura, o período de molhamento foliar constitui um fator importante no desenvolvimento da ferrugem. Associado a uma faixa ideal de temperatura, um período de 6 a 10 horas de molhamento foliar proporciona condições ideais para a infecção do fungo. MELCHING et al. (1989) avaliaram o efeito da temperatura e molhamento foliar no tempo para penetração da ferrugem e demonstraram um período de 6 horas na faixa de temperatura de 18 a 26 °C.

O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* inicia-se com a produção de urediósporos (esporos) provenientes das urédias - estruturas de frutificação do fungo (ZAMBOLIM, 2006). Os urediósporos são facilmente disseminados pelo vento, atingindo assim, lavouras próximas ou distantes (YORINORI, NUNES JUNIOR & LAZZAROTTO, 2004).

Em condições favoráveis para o desenvolvimento, ao atingirem as folhas de soja, ocorre a germinação dos urediósporos, com a conseqüente formação do apressório (estrutura de fixação do fungo), ocorrendo a penetração diretamente pela epiderme da folha, raramente pelos estômatos (ZAMBENEDETTI, 2005).

Sob condições favoráveis à infecção e colonização, os sintomas podem surgir de 5 a 7 dias, com a conseqüente formação de urediósporos num período de 9 a 12 dias após a germinação e penetração. As urédias podem produzir urediósporos por até 3 semanas (ZAMBOLIM, 2006).

As lesões foliares causadas por *P. pachyrhizi* são pequenas manchas de coloração castanha a marrom-escuro. À medida que ocorre a esporulação, o tecido da folha adquire coloração castanho-clara (lesão tipo TAN, característica de genótipos suscetíveis) a castanho-avermelhada (lesão tipo RB – *reddish-brown*, característica de genótipos tolerantes) (BROMFIELD, 1982).

2.2.3 – Métodos de Controle

As variações climáticas nas diversas áreas de cultivo de soja podem exercer influência na severidade final da doença, o que dificulta uma recomendação genérica de controle que satisfaça todas as regiões.

Atualmente o controle químico e o manejo da cultura têm sido os meios de minimizar os danos causados pela ferrugem asiática da soja. Algumas medidas têm sido adotadas, como semear cultivares mais precoces e evitar a semeadura em várias épocas e cultivares tardias; Essas medidas reduziram os danos por receber uma maior carga de esporos multiplicados nas primeiras semeaduras. Além disso, semear a soja com densidade de plantas que favoreça bom arejamento foliar contribui para otimizar a penetração e a cobertura pelos fungicidas (YORINORI, NUNES JUNIOR & LAZZAROTTO, 2004; ANDRADE & ANDRADE, 2006).

O controle químico da doença, com a aplicação de fungicidas, tem sido uma medida adotada pelos agricultores, aliada a um correto monitoramento, estabelecendo unidades de alerta em períodos de

semeadura da cultura (ANDRADE & ANDRADE, 2006). Para a safra 2007/2008, 35 produtos comerciais encontram-se registrados para o controle da ferrugem (EMBRAPA-SOJA, 2007d).

A obtenção de cultivares de soja resistente à doença tem sido um desafio à pesquisa. Quatro genes foram identificados como responsáveis pela tolerância e conseqüentemente levando à ocorrência de lesões do tipo RB nos cultivares, sendo eles *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* (McLEAN & BYTH, 1980; HARTING, 1986). No entanto, *Rpp1* e *Rpp3* tiveram sua resistência quebrada, restando apenas *Rpp2* e *Rpp4* conferindo tolerância às raças fisiológicas do patógeno existentes no Brasil (ARIAS et al., 2004).

2.3 – Mecanismos de Resistência a Doenças em Plantas

Em termos fitopatológicos, a doença é vista como uma interação entre dois organismos: de um lado a planta, que recebe a denominação de hospedeiro, e de outro, o agente causador da doença, chamado de patógeno (KRUGNER, 1995).

Segundo AGRIOS (2004), uma planta é considerada saudável, ou normal, quando ela pode executar suas funções fisiológicas no melhor do seu potencial genético. Quando a habilidade das células de uma planta, ou parte da planta, em executar as funções fisiológicas é interferida por um organismo patogênico ou um fator ambiental adverso, as atividades celulares são interrompidas, alteradas ou inibidas, a célula passa a funcionar mal, ou morre, e a planta desenvolve uma doença.

Inúmeros organismos podem causar doenças em plantas, tais como vírus, bactérias, fungos, nematóides e protozoários (HARRAR & STACKMAN, 1957; FRY, 1982; BEDENDO, 1995a; SALGADO & FERREIRA, 1995; BACCHI & KRUGNER, 1995; MONTEIRO & FERRAZ, 1995; BEDENDO, 1995b; AGRIOS, 2004).

Geralmente, um determinado patógeno é específico para um determinado hospedeiro. A presença no patógeno, de um ou mais genes para patogenicidade, especificidade e virulência contra um particular hospedeiro é que possibilita o desenvolvimento da doença (AGRIOS, 2004).

A resistência de um hospedeiro, dentro de um contexto fisiológico, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou o subsequente ataque de um patógeno em seus tecidos (LEITE & PASCHOLATI, 1995). A tolerância, por sua vez, provém em suportar um ataque do patógeno sem que ocorram danos significativos em sua produção (CAMARGO, 1995).

Num contexto genético, a interação entre a planta e o patógeno, seria devido à presença de um gene de resistência (*R*) no hospedeiro e um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno, conforme proposto na chamada teoria gene-a-gene (FLOR, 1971). De acordo com esta teoria a indução da resposta de defesa é iniciada pelo reconhecimento por parte da planta hospedeira, de moléculas sinalizadoras específicas (elicitors), codificadas por genes *Avr* do patógeno. As proteínas que reconhecem os elicitors são codificadas por genes *R* correspondentes, presentes nas

células vegetais. O reconhecimento do elicitor leva a uma cascata de eventos de transdução de sinais que irá ativar genes da célula vegetal hospedeira, resultando em uma rápida resposta de defesa. Quando o patógeno não tem o correspondente gene *Avr* ele não é reconhecido pelo hospedeiro e, portanto, não ocorre indução dos mecanismos de defesa, ou esta ocorre de um modo bastante lento, o que possibilita o crescimento do patógeno e o desenvolvimento da doença.

A resistência monogênica (vertical) envolve a presença de um único gene, sendo este suficiente para conferir o efeito (CAMARGO, 1995). Usualmente, a resistência condicionada por um único gene é estável sobre uma grande variação de condições ambientais. Entretanto, a expressão da resistência algumas vezes é alterada pelo estágio de desenvolvimento da planta (HOOKER & SAXENA, 1971). Porém existem questionamentos sobre as terminologias adotadas para a resistência, atribuindo àquelas ocasionada por poucos genes (oligogênica), como uma resistência vertical.

Existem casos em que a resistência ocorre devido ao envolvimento de vários genes (resistência poligênica ou horizontal). Em um mesmo hospedeiro, mecanismos de resistência monogênicos e poligênicos podem estar presentes (HOOKER & SAXENA, 1971, CAMARGO, 1995, AGRIOS, 2004).

O reconhecimento da presença do patógeno conduz a respostas de defesa do hospedeiro, que incluem, por exemplo, a morte celular programada de células da planta que estão em contato com o patógeno;

um fenômeno chamado de resposta de hipersensibilidade (HR) (GLAZEBROOK, 2001). Esta reação culmina na parada do crescimento e do desenvolvimento do patógeno nos tecidos da planta.

Durante os mecanismos celulares de defesa, há a formação de substâncias reativas de oxigênio devido a combustão oxidativa, alteração do potencial de membrana e aumento na concentração de moléculas sinalizadoras. Ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno, óxido nítrico bem como as “espécies reativas de oxigênio” são exemplos de sinalizadores para a ativação de genes envolvidos na resposta de resistência (GLAZEBROOK, 2001; SINGH, FOLEY & OÑATE-SANCHEZ, 2002; FARMER, ALMÉRAS & KRISHNAMURTHY, 2003; WENDEHENNE, DURNER & KLESSIG, 2004).

Tais moléculas sinalizadoras podem induzir a expressão das chamadas proteínas relacionadas à patogênese - proteínas PR (*Pathogenesis-related*). Estas proteínas são produzidas pela planta hospedeira, mas induzidas sobre condições patológicas (VAN LOON & STRIEN, 1999). Como exemplos de proteínas PR, podem-se mencionar as quitinases e glucanases (KITAJIMA & SATO, 1999).

Quitinases e β -1,3-glucanases são enzimas líticas que ocorrem normalmente nas plantas. Elas hidrolisam a quitina e as β -1,3-glucanas e podem estar envolvidas na defesa contra fungos, visto que os polímeros citados mostram-se como os principais constituintes da parede celular fúngica (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Os mecanismos de resistência são geralmente divididos em duas categorias: pré-formados (passivos) e pós-formados (ativos). Ambos podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos. Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que as reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro visam criar condições adversas ao crescimento do patógeno ou mesmo apresentarem-se como substâncias tóxicas (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Outro grupo de substâncias que são expressas sobre patogenicidade, são as fitoalexinas, que são constituintes dos fatores de resistência bioquímicos pós-formados. São definidas como compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sendo sintetizados pelas plantas e se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Essas moléculas são produzidas em resposta ao reconhecimento de um elicitor, que podem ser constituintes de microrganismos, bem como presentes na parede celular da planta (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984).

A forma como uma planta vem a desenvolver um mecanismo de resistência frente a um determinado patógeno tem sido foco de muitos estudos, aliando as mais diversas áreas do conhecimento, como fitopatologia, biologia molecular, bioquímica e genética. Uma vez que a interação planta-patógeno pode ser diferente dependendo do patossistema considerado, a busca pelo entendimento dos mecanismos de resistência estará sempre à luz de novas elucidações.

3 - OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo, estimar, através da técnica de PCR em tempo real, os níveis de expressão de genes que supostamente estejam envolvidos no mecanismo de defesa da soja à ferrugem asiática, causada pelo fungo *P. pachyrhizi*.

3.1 - Objetivos Específicos

- Selecionar genes que estejam relacionados ao mecanismo de defesa contra patógenos.
- Compreender, em parte, o mecanismo molecular de defesa da soja, frente ao patógeno *P. pachyrhizi*.
- Gerar conhecimento para o desenvolvimento de estratégias eficientes no controle da doença.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Seleção dos Genes

A seleção dos genes para a análise da expressão gênica em soja após a infecção com a ferrugem asiática foi baseada em revisão de literatura, visando identificar genes envolvidos na resposta de resistência e mecanismos de defesa. Após a seleção promoveu-se o acesso das seqüências no banco de dados GenBank, disponibilizado gratuitamente no link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

4.2 – Construção dos Oligonucleotídeos

Após a seleção dos genes, foram confeccionados os oligonucleotídeos para a análise da expressão gênica em soja após inoculação com *P. pachyrhizi*.

Foi utilizado o programa VECTOR NTI[®] (distribuído gratuitamente pela Invitrogen[®], através do link www.invitrogen.com/vectorNTIcommunity) para o manuseio das seqüências disponibilizadas no GenBank e avaliação dos oligonucleotídeos desenhados.

Após a identificação das regiões específicas para um determinado gene, selecionadas a partir do alinhamento entre genes relacionados à mesma proteína, foi utilizado o programa Primer Express^{TM 2} 2.0, (Applied Biosystems) para a confecção dos oligonucleotídeos. Os parâmetros utilizados para a construção dos mesmos estão especificados na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para a construção dos oligonucleotídeos.

Temperatura de anelamento	Mínimo: 58 °C	Máximo: 62 °C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	Mínimo: 20%	Máximo: 80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	Mínimo: 18 bases	Máximo: 25 bases
T _m do <i>Amplicon</i>	Mínimo: 75 °C	Máximo: 85 °C
Tamanho do <i>Amplicon</i>	Mínimo: 50 bases	Máximo: 150 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado novamente o programa VECTOR NTI[®] para verificar a formação de dímeros, dobramento (*hairpin*) e força de ligação entre os oligonucleotídeos.

4.3 – Material Biológico

Foram utilizados dois genótipos de soja. Embrapa-48, uma cultivar suscetível a *P. pachyrhizi* (Embrapa-Soja, 2006b), e PI 230970, que possui o alelo *Rpp2*, sendo tolerante ao patógeno (USDA, 2007).

O material foi cedido pelo Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa-Soja.

4.4 – Delineamento Experimental

O experimento foi montado em três Fitotrons (sala climatizada), sendo cada, uma unidade independente. Cada Fitotron estava programado para uma temperatura de 22 °C e um fotoperíodo de 14 horas.

Para a análise de expressão gênica foram definidos 7 (sete) tempos de coleta do material, após inoculação: 1 hora, 12 horas, 24 horas, 48 horas e 192 horas.

As sementes dos genótipos foram distribuídas em vasos devidamente identificados. Em cada Fitotron, para cada genótipo, foram utilizados quatorze vasos, contendo quatro plantas cada. Esses vasos foram distribuídos em dois grupos: plantas que receberam a inoculação do fungo *P. pachyrhizi* e plantas que receberam uma falso-inoculação (água) (Figura 1).

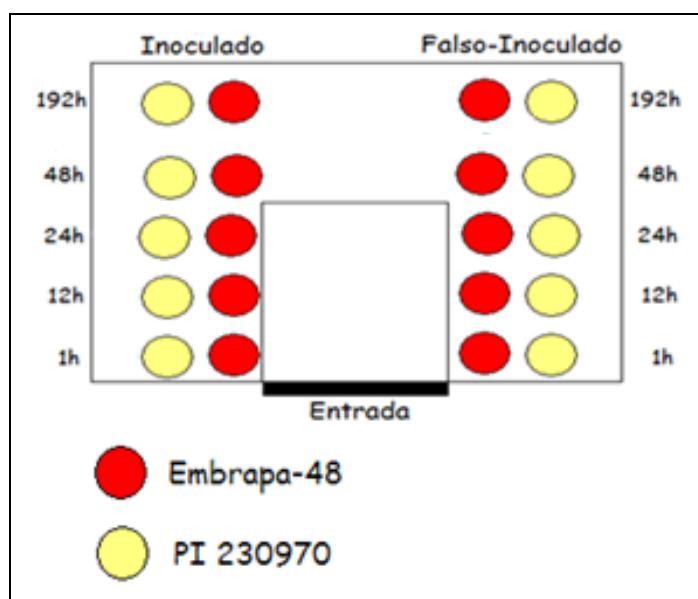


Figura 1 - Esquema da disposição do material no Fitotron

4.5 – Inoculação do Patógeno

As plantas foram inoculadas no estágio de desenvolvimento V2-V3, de acordo com a escala fenológica de FEHR & CAVINESS (1977). Inicialmente as plantas controle receberam a inoculação com água. A água foi borrifada sobre as plantas, que posteriormente foram cobertas com sacos plásticos. No segundo grupo de plantas (inoculados com o fungo *P. pachyrhizi*), foi borrifada uma solução contendo 0,05% de polioxietileno sorbitano monolaurato (Tween 20) e água com esporos do fungo, numa concentração de 300.000 esporos por mL. Após a inoculação, as plantas também foram cobertas com sacos plásticos. Posteriormente, todo o material foi transferido para o Fitotron (Figura 2).



Figura 2 - Ilustração dos vasos no Fitotron

4.6 – Coleta do Material

Para a análise da expressão gênica foi coletado um trifólio de uma das quatro plantas de cada vaso. Os vasos foram identificados pelo genótipo, tratamento e tempo de coleta. Cada vaso continha plantas enumeradas de 1 a 4, sendo que apenas uma delas foi utilizada para a extração de RNA. A escolha das plantas a ser extraído o RNA foi feita após análise fenotípica (dados não apresentados).

Após a retirada do trifólio, o mesmo foi embalado em papel alumínio, identificado com o genótipo, tratamento, tempo de coleta e número da planta. O material foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer -80 °C para a posterior extração do RNA (Figura 3).

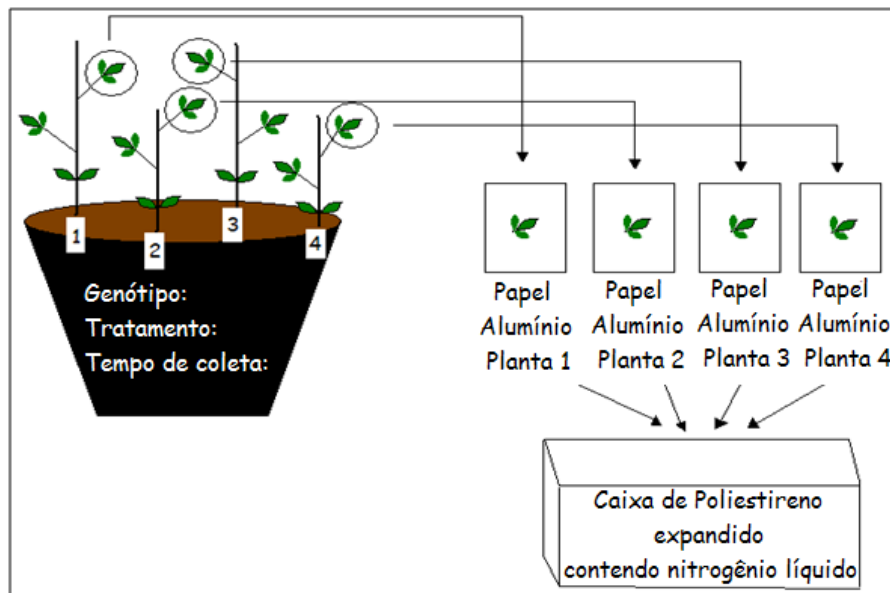


Figura 3 - Esquema da coleta do material

4.7 – Extração do RNA

A extração de RNA das amostras coletadas foi feita utilizando o reagente TRIZOL, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen™). Todas as etapas para isolamento do mRNA para análise de expressão gênica foram conduzidas a 4 °C. A água e as soluções utilizadas foram tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%, a 37°C por 8 h, e, em seguida, autoclavadas. Cerca de 100 mg de folhas das cultivares de soja Embrapa-48 e PI 230970 foram triturados em nitrogênio líquido.

O material triturado foi transferido para tubos eppendorfs de 1,5 mL, adicionando 1 mL de TRIZOL. Após a adição do TRIZOL, o material foi misturado com o auxílio de um vortex, por aproximadamente 1 minuto e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm.

Após a centrifugação o *pellet* foi descartado e o sobrenadante transferido para novos tubos, deixando em temperatura ambiente (15 a 30°C) por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 200µL de clorofórmio e o material homogeneizado em vortex por aproximadamente 15 segundos.

Após permanecer em temperatura ambiente por 3 minutos, procedeu-se uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm. Aproximadamente 500 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol. O material foi homogeneizado manualmente e deixado em sala climatizada por 10 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada (10 minutos por 12.000

rpm) onde posteriormente o sobrenadante foi descartado, permanecendo o *pellet* formado. Foi adicionado 1 mL de etanol 75%, seguido de uma homogeneização em vortex por 15 segundos.

Após centrifugar por 5 minutos a 9.500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* permaneceu em temperatura ambiente por 8 minutos. Foram utilizados 50 µL de água milli-Q tratada com DEPC, para ressuspender o *pellet*. O material foi armazenado em freezer -80°C.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante (contendo 0,6 moles/L de formaldeído), a 1% e contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio. Como tampão de corrida foi utilizado o tampão TBE (Tris – 10,8 g, Ácido Bórico – 5,5 g e EDTA – 4 mL 0,5 M pH 8,0).

4.8 – Síntese do cDNA

A primeira fita do cDNA foi sintetizada com auxílio da transcriptase reversa MMLV-RT (*Maloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase*) e oligonucleotídeos aleatórios (*primer* randômico).

À cerca de 1,5 µg de RNA foi adicionado 1µg do *primer* randômico, sendo o volume final da reação, 11 µL, ajustado pela adição de água tratada com DEPC. A reação foi incubada por 3 minutos à temperatura 80 °C. Posteriormente foi transferido para o gelo, sendo adicionado o mix da reação, constituído por: 6 µL de RT-Buffer (5x), 4µL de dNTP's (0,4 mM),

2 µL de DTT (0,8 mM) e 2 µL Transcriptase Reversa (400 U/mL). A reação foi novamente incubada no termociclador a 37 °C por 60 minutos permanecendo 10 minutos a 65 °C.

4.9 – PCR Qualitativo

O PCR qualitativo foi utilizado para verificar a amplificação dos oligonucleotídeos antes de iniciarmos os testes em PCR quantitativo em tempo real. O material utilizado foi DNA genômico de soja e dois tipos de cDNA (após inoculação com o fungo *P. pachyrhizi* e outro após inoculação com o nematóide *Meloidogyne javanica*).

As condições de termociclagem foram 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida de 60 °C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP's (2,5 mM), 0,2 µL de Taq-Polimerase (5 U/µL), 0,5 µL de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (10 µM) e 2 µL de DNA genômico ou cDNA, completando com Água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

4.10 – PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em equipamento ABI PRISM® 7300 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A amplificação dos genes alvos foi realizada utilizando-se a metodologia SYBR Green. Como referência endógena foi utilizado o gene que codifica rRNA 18S. A amplificação dos genes alvos e da referência endógena foi realizada em diferentes tubos, na mesma placa de reação.

A amplificação de cada sistema foi avaliada previamente a fim de que a eficiência dos genes alvo e a referência endógena se mostrassem similares.

A eficiência da amplificação é medida pela fórmula: $E = [10^{-1/slope}] - 1$, onde o *slope* indica a inclinação da reta, cujo valor próximo a -3,3 indica uma eficiência próxima de 100%. Após verificar a eficiência do gene, escolheu-se a diluição do cDNA e a concentração dos oligonucleotídeos adequadas para preparar as reações da quantificação relativa.

À 2 µL da reação da primeira fita do cDNA foram adicionados 0,2 a 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo e 12,5 µL do tampão SYBR Green master mix, que contém todos os componentes necessários à amplificação (as enzimas uracil N-glicosilase e AmpliTaq Gold, MgCl₂, dNTPs, KCl e o fluoróforo SYBR green), em um volume final de 25 µL.

Em cada placa, foram amplificadas amostras controle, que apresentavam todos os reagentes necessários à amplificação, exceto DNA. As condições de termociclagem foram 50 °C por 2 minutos, para permitir a ação da uracil N-glicosilase, 95 °C por 10 minutos para a

ativação da DNA polimerase “*Hot Start*” que é pré-complexada, com um anticorpo monoclonal específico que inibe a atividade da DNA polimerase em temperatura ambiente, e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, seguida de 60 °C por 1 minuto, para anelamento dos oligonucleotídeos e amplificação. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um período adicional de 30 minutos, com elevação gradual da temperatura de 60 °C a 94 °C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para cada tratamento é detectado o valor de Ct (*Cycle threshold*), tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do Ct do gene alvo é subtraído do valor do Ct do controle endógeno, para normalizar a reação. Obtém então o valor de ΔCt . O valor de ΔCt dos tratamentos é subtraído do valor do ΔCt da amostra controle (calibrador), tendo-se o valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

4.11 – Análise Estatística

Foi realizada uma análise de variância combinada, utilizando como repetições as triplicatas do material biológico, presentes em cada placa da análise de PCR em tempo real.

Os níveis de expressão dos genes avaliados entre cada tratamento, inoculado e não inoculado, dentro de cada Fitotron, foram analisados pelo teste t ao nível de 5 e 1% de significância.

5 – RESULTADOS

5.1 – Seleção dos genes para a análise da expressão gênica

Para análise de expressão gênica foram utilizados genes que estão envolvidos em mecanismos de defesa ou que são ativados por mudanças fisiológicas na planta em resposta à patógenos (Figura 4). Foi feita uma revisão de literatura para a identificação dos mesmos, sendo eles: fenilalanina amônia liase (*PAL*), chalcona sintase 1 (*Gmchs1*), superóxido dismutase (*SodB2*), lipoxigenase (*lox7*), quitinase (*chib1-A*), beta-1,3-endoglucanase (*Endogluc*), mensageiro associado a estresse (*sam22*), fator de ribosilação do ADP (*ARF*) e inibidor de poligalactunorase 3 (*pgip3*).

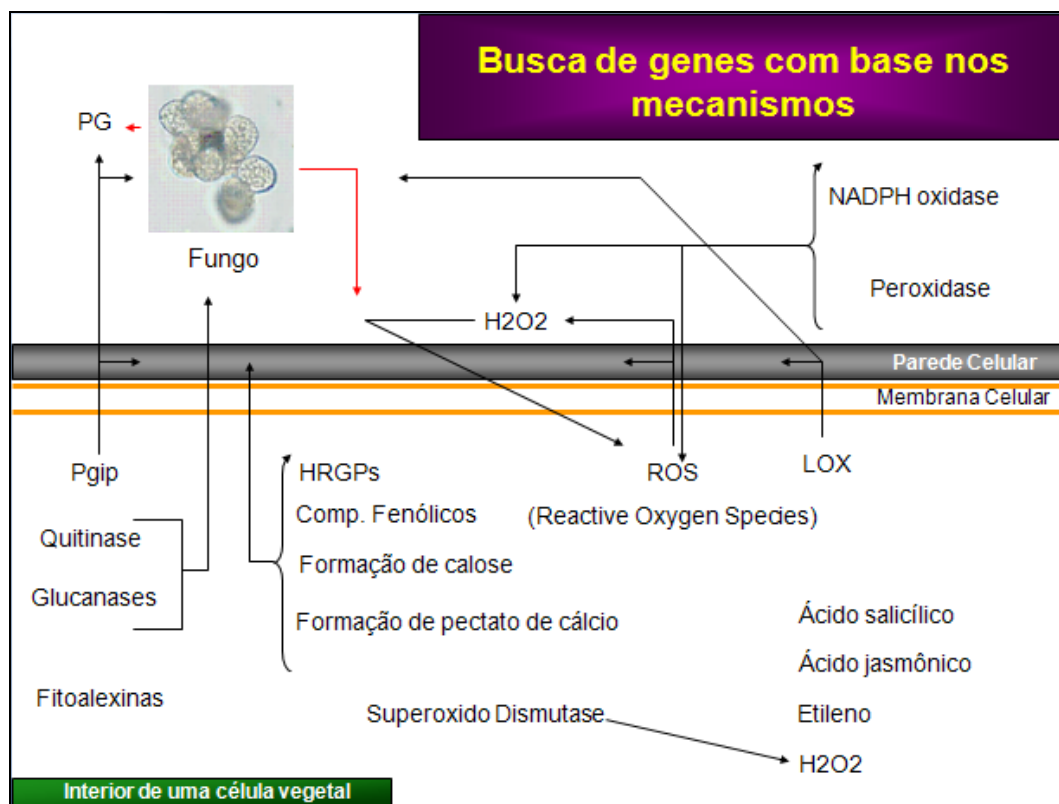


Figura 4 - Esquema ilustrando possíveis mecanismos de ativação gênica na planta, em resposta à presença de um fungo patogênico.

5.2 – Acesso dos genes no GenBank

Após a escolha dos genes, foi feita uma busca pela sua seqüência no banco de dados GenBank. Inicialmente a busca foi feita com base na seqüência protéica, pois desta forma reduziria o número de acessos. Ao nome da proteína foi acrescido o termo *Glycine max*, para especificar o organismo de interesse.

Foi verificado que alguns genes possuíam mais de um acesso. Isso se deve ao fato da presença de mais de um tipo de proteína relacionada à mesma função. Por conseguinte, com base na revisão de literatura, foi feita a escolha do gene específico (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de acesso no GenBank, dos genes utilizados no experimento.

<i>Proteína</i>	<i>Nº de acesso da proteína</i>	<i>Gene</i>	<i>Nº de acesso do gene</i>
Inibidor de poligalacturonase	CAI99394	<i>pgip3</i>	AJ972662
Chalcona sintase	CAA38456	<i>Gmachs1</i>	X54644
Fenilalanina amonia liase	P27991	<i>PAL 1</i>	X52953
Mensageiro associado a estresse	CAA42646	<i>Sam22</i>	X60043
Fator de ribosilação do ADP	AAD17207	<i>ARF</i>	AF114796
Quitinase	BAA77676	<i>Chib1-A</i>	AB007126
Beta-1,3-endoglucanase	AAA33946	<i>Endogluc</i>	M37753
Superóxido dismutase	AAQ13492	<i>SodB2</i>	AF108084
Lipoxigenase	AAC49159	<i>Lox7</i>	U36191

5.3 – Construção dos Oligonucleotídeos

Após a escolha dos genes, foi utilizado o programa VECTOR NTI® para o manuseio das seqüências. Uma vez que algumas proteínas apresentavam mais de um acesso para os genes, foi necessário fazer um alinhamento entre os nucleotídeos, utilizando o programa ClustalW (1.83), com o objetivo de selecionar as regiões candidatas para a construção dos oligonucleotídeos, sendo estas, específicas para um determinado gene.

Outro procedimento adotado antes da construção dos oligonucleotídeos foi a identificação de regiões conservadas na proteína. Essa análise teve por objetivo evitar o uso de nucleotídeos que estavam associados a domínios conservados entre proteínas diferentes.

Entre os genes selecionados, *pgip3* apresentava somente a seqüência de nucleotídeos traduzida, demarcada do códon de iniciação ATG ao códon de parada ATT. O alinhamento entre *pgip3* e os outros 3 genes para a proteína Pgip (*pgip1*, *pgip2* e *pgip4*) revelou grande identidade entre os mesmos, disponibilizando poucas regiões de nucleotídeos específicas para o gene *pgip3*.

A estratégia adotada foi a identificação de regiões além do códon de parada do gene, com o objetivo de encontrar a região 3' não-traduzida e assim, construir o oligonucleotídeo nessa região.

Para realizar a extensão desse gene, foi selecionada a seqüência de nucleotídeos do mesmo e promovido um alinhamento com ETS's (*Expressed Sequence Tag*) de soja. Foi utilizado o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponibilizado gratuitamente no link

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. A partir desse alinhamento, estendeu-se 180 nucleotídeos na região 3' não-traduzida do gene, identificando a cauda poli-A do mesmo. Essa região foi utilizada para a construção dos oligonucleotídeos para *pgip3*.

Uma vez selecionadas as regiões dos genes para a construção dos oligonucleotídeos, foi utilizado o programa Primer ExpressTM 2.0 para a confecção dos mesmos. Após a seleção dos pares de oligonucleotídeos para cada gene, foi realizada a análise da força de ligação e formação de dímeros entre os primers, utilizando o VECTOR NTI[®].

Para o gene *lox7*, foram construídos dois pares de oligonucleotídeos. Um amplificando a região 5' não-traduzida do gene e o outro amplificando a região 3' não-traduzida. Esta estratégia foi adotada uma vez que se encontrou dificuldade em construir os oligonucleotídeos para esse gene, pois apresentava elevada identidade entre os nucleotídeos dos genes para as demais lipoxigenases em soja, bem como regiões que atendessem aos parâmetros utilizados para a construção dos oligonucleotídeos.

Na tabela 3 são apresentadas as seqüências dos oligonucleotídeos, tamanho do *amplicon* e a temperatura de anelamento (TA) estimada pelo programa Primer ExpressTM 2.0 para cada oligonucleotídeo.

Tabela 3 - Seqüência dos oligonucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento.

Gene Alvo	Seqüência	Amplicon	TA °C
Inibidor de poligalacturonase 3 (<i>Pgip3</i>)	F: GTTTGTGTGGCTCTCCTCTTCC	85 pb	59
	R: CCATCCGTTCTTATTAATCCAAGC		59
Chalcona sintase 1 (<i>Gmchs1</i>)	F: TTGCTACTTCCCCTTCCATTCTT	111 pb	59
	R: GTGCCAATAGCCATGACAGTG		58
Fenilalanina amônia liase 1 (<i>Pal 1</i>)	F: GCAATTCCAAACAAGATCCAAGA	79 pb	59
	R: GCAACCCAGTCCCTAATTCTC		60
Mensageiro associado a estresse (<i>Sam22</i>)	F: ACACGGCGGAGAAGATCACAT	78 pb	60
	R: TGACAGTGAGCTTCCCAGCAG		60
Fator de ribosilação do ADP (<i>ARF</i>)	F: TGAAGGTTTGGACTGGCTTTC	87 pb	58
	R: CGCATGAAATCACCAGACAAG		58
Quitnase (<i>Chib1-A</i>)	F: CCCTGATGCTCACTTGGATAGA	83 pb	58
	R: GCATGAAGGGTTGTTGTAGAAT		58
Beta-1,3 endoglucanase (<i>Endogluc</i>)	F: TTGGGGGCTCTTTTCTCCTAT	86 pb	58
	R: TCACACCAAATTATGCTTCTGCT		58
Superóxido dismutase (<i>SodB2</i>)	F: TGGCGTCATGAGGAATAGTGGAT	120 pb	61
	R: AGAACATAATCTGCAGGCTGAAGTG		60
Lipoxigenase 7 (<i>Lox7_5UTR</i>)	F: ACAAGCTAGGCACAAGAAAACCA	111 pb	60
	R: TTGTTCCCTCCGATGATTCCAA		60
Lipoxigenase 7 (<i>Lox7_3UTR</i>)	F: TTGAGGTTGCTGTACTACTCTGCC	99 pb	59
	R: CACCCCAAATGTAACCTTGACCAT		59

5.4 – Teste de amplificação dos oligonucleotídeos

Antes de se iniciar as análises de PCR em tempo real, foi feito um teste de amplificação dos oligonucleotídeos através do PCR convencional. Para realizar este teste utilizou-se como material a ser amplificado cDNA e DNA genômico de soja.

Quando foi utilizado DNA genômico de soja para a amplificação, com todos os oligonucleotídeos, foram obtidos fragmentos com tamanho conforme o esperado (figura 5), com exceção de *Lox7_5UTR* que não amplificou, e *ARF*, que amplificou um fragmento de aproximadamente 550pb, o que indica a possivelmente a presença de um *intron* na região flanqueada por esses dois oligonucleotídeos.

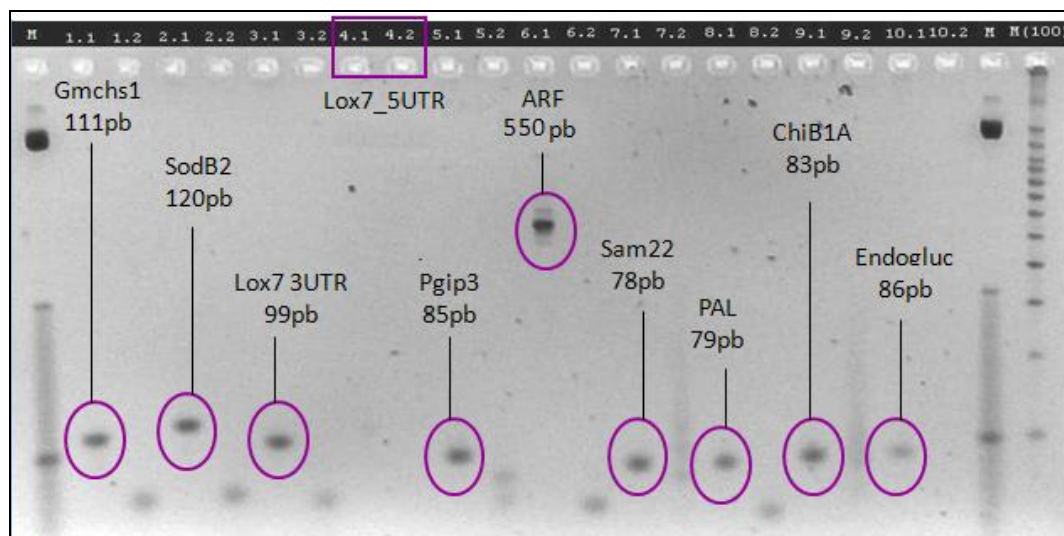


Figura 5 - Amplificação dos oligonucleotídeos utilizando DNA Genômico de Soja. M (marcador 100pb) 1.1 (*Gmchs1*), 1.2 (controle *Gmchs1*); 2.1 (*SodB2*), 2.2 (controle *SodB2*), 3.1 (*Lox7_3UTR*), 3.2 (controle *Lox7_3UTR*); 4.1 (*Lox7_5UTR*), 4.2 (controle *Lox7_5UTR*); 5.1 (*Pgip3*), 5.2 (controle *Pgip3*); 6.1 (*ARF*), 6.2 (controle *ARF*); 7.1 (*Sam22*), 7.2 (controle *Sam22*); 8.1 (*PAL*), 8.2 (controle *PAL*); 9.1 (*Chib1A*), 9.2, (controle *Chib1A*); 10.1(*Endogluc*), 10.2 (controle *Endogluc*).

A amplificação utilizando cDNA após inoculação com *P. pachyrhizi* e *M. javanica* também levou à produção de fragmentos com os tamanhos esperados. O oligonucleotídeo *Lox7_5UTR* que em DNA genômico não havia amplificado, produziu, em cDNA, uma banda de tamanho correspondente ao seu *amplicon* (111pb). *ARF*, em cDNA, amplificou um fragmento de 87pb (figura 6). Isso reforça a possibilidade da presença de um *intron* em ambos os genes, visto a diferença na amplificação gerada em DNA genômico e cDNA.

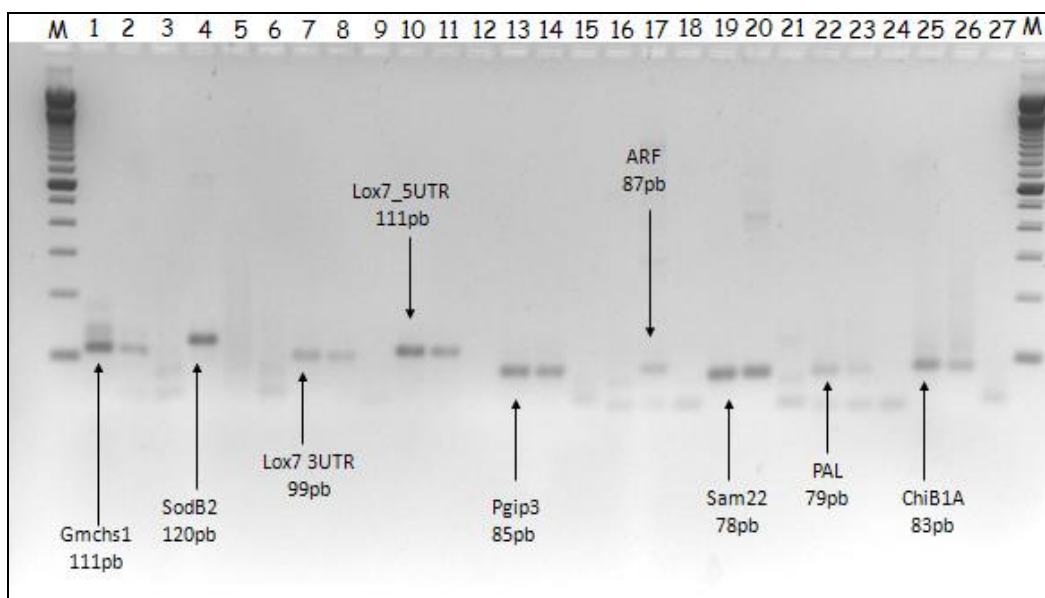


Figura 6 – Amplificação dos oligonucleotídeos utilizando cDNA de soja inoculado com *P. pachyrhizi* e *Meloidogyne javanica*. M (marcador 100pb); 1 (*Gmchs1* – cDNA *P. pachyrhizi*); 2 (*Gmchs1* – cDNA *M. javanica*); 3 (controle *Gmchs1*); 4 (*SodB2* - cDNA *P. pachyrhizi*; 5 (*SodB2* – cDNA *M. javanica*); 6 (controle *SodB2*); 7 (*Lox7_3UTR* - cDNA *P. pachyrhizi*; 8 (*Lox7_3UTR* - cDNA *M. javanica*); 9 (controle *Lox7_3UTR*); 10 (*Lox7_5UTR* - cDNA *P. pachyrhizi*; 11 (*Lox7_5UTR* - cDNA *M. javanica*); 12 (controle *Lox7_5UTR*); 13 (*Pgip3* - cDNA *P. pachyrhizi*; 14 (*Pgip3* - cDNA *M. javanica*); 15 (controle *Pgip3*); 16 (*ARF* - cDNA *P. pachyrhizi*; 17 (*ARF* - cDNA *M. javanica*); 18 (controle *ARF*); 19 (*Sam22* - cDNA *P. pachyrhizi*; 20 (*Sam22* - cDNA *M. javanica*); 21 (controle *Sam22*); 22 (*PAL* - cDNA *P. pachyrhizi*; 23 (*PAL* - cDNA *M. javanica*); 24 (controle *PAL*); 25 (*Chib1A* - cDNA *P. pachyrhizi*; 26 (*Chib1A* - cDNA *M. javanica*); 27 (controle *Chib1A*).

Um novo teste de amplificação foi realizado, com o objetivo de verificar a faixa de amplificação dos oligonucleotídeos, com exceção de *Gmchs1* e *SodB2*, que apresentaram uma banda de alta intensidade quando amplificados a 60 °C. Foi estabelecido um gradiente de temperatura de amplificação, variando de 58 °C a 62 °C.

Todos os oligonucleotídeos amplificaram dentro da faixa de temperatura estabelecida (figura 7 e 8). Este teste possibilitou a escolha do oligonucleotídeo a ser utilizado para a amplificação do gene lipoxigenase, sendo aqueles que anelam na região 5' não-traduzida do gene.

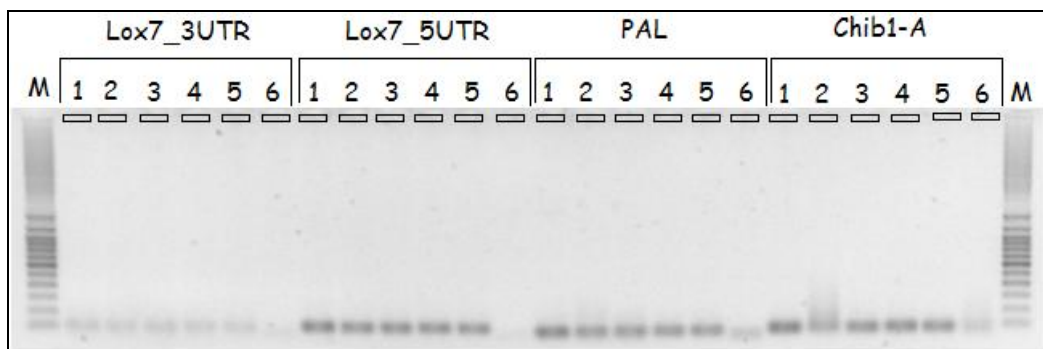


Figura 7 – PCR Gradiente para os oligonucleotídeos Lox7_3UTR, Lox7_5UTR, PAL e Chib1-A. M (Marcador 100pb), 1 (58 °C), 2 (59 °C), 3 (60 °C), 4 (61 °C), 5 (62 °C) e 6 (controle).

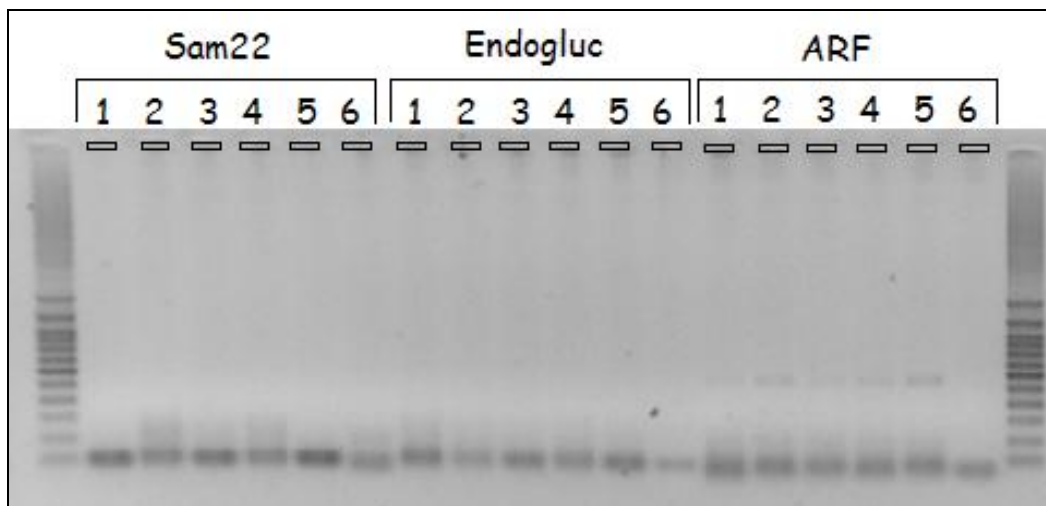


Figura 8 - PCR Gradiente para os oligonucleotídeos Sam22, Endogluc e ARF. M (Marcador 100pb), 1 (58 °C), 2 (59 °C), 3 (60 °C), 4 (61 °C), 5 (62 °C) e 6 (controle).

5.5 – Quantificação Relativa dos Genes Envolvidos na Resposta de Resistência

A quantificação da expressão de genes potencialmente ativados pela presença de *P. pachyrhizi* em soja foi determinada pela quantificação relativa pela técnica de PCR em tempo real. As amostras de folhas dos genótipos Embrapa-48 e PI 230970 foram coletadas 1 hora, 12 horas, 24 horas, 48 horas e 192 horas após a infecção, e após a extração do mRNA as mesmas foram homogeneizadas em *bulks* para posterior síntese do cDNA.

A obtenção da curva de amplificação obtida por PCR quantitativo para cada par de oligonucleotídeos a partir da diluição das amostras de cDNA, permitiu que os ajustes fossem feitos. Isto garantiu que a eficiência de amplificação entre os genes alvos e a referência endógena fosse similar, e conseqüentemente permitiram que as análises dos níveis de

expressão fossem realizadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

A curva de dissociação gerada para os produtos de amplificação demonstrou que todos os oligonucleotídeos estavam amplificando um único fragmento, não havendo amplificação inespecífica.

A expressão dos genes analisados foi muito diferente entre os Fitotrons, não sendo possível observar repetibilidade nos resultados obtidos entre os mesmos.

Considerando o primeiro Fitotron, observou-se que o gene *Chib1-A* se expressou 117 vezes mais na PI 230970 inoculada com o patógeno *P. pachyrhizi*, quando comparado com o falso-inoculado. Em relação à Embrapa-48, observou-se uma expressão 1,75 vezes mais que o falso-inoculado. Para o gene *sam22*, a expressão só foi significativa no genótipo tolerante inoculado, que se expressou 12,85 vezes mais. Não houve expressão diferencial entre inoculado e não inoculado na Embrapa 48.

Os genes *PAL*, *Gmchs1*, *Endogluc*, *SodB2*, *Pgip3* e *Lox7_5UTR* também apresentaram expressão diferencial nos dois genótipos. O gene *ARF* demonstrou uma expressão diferencial apenas no genótipo suscetível.

Já no segundo Fitotron, o gene que se destaca com maior expressão é o *Gmchs1*, no genótipo tolerante inoculado, sendo 53,74 vezes mais expresso que a amostra calibradora. Para este mesmo gene, Embrapa-48 inoculado também aumentou sua expressão, sendo 21,9

vezes mais expresso. *Chib1-A* também foi um gene que se destacou, sendo diferencialmente expresso nos dois genótipos, o mesmo acontecendo com o gene *pgip3*.

Os genes *Endogluc*, *SodB2* e *Lox7_5UTR* tiveram expressão diferenciada na PI230970, quando inoculado com fungo. No genótipo Embrapa-48 não foi observada diferença de expressão para esses genes. Em contrapartida, os genes *PAL*, *ARF* e *sam22* tiveram expressão diferenciada no genótipo suscetível. No genótipo PI 230970 não foi observada diferença de expressão para esses genes.

No terceiro Fitotron o gene *Chib1-A* foi diferencialmente expresso em ambos os genótipos, ao passo que *Gmchs1* e *PAL* somente no genótipo PI 230970 e o gene *Sam22* na cultivar Embrapa-48. Todos os demais genes apresentaram expressão diferencial em ambos os genótipos.

A tabela 4 sumariza os dados obtidos.

Tabela 4 – Valores da quantificação relativa (RQ) dos genes relacionados à resposta à infecção de *P. pachyrhizi* nos genótipos PI 230970 e Embrapa 48, após inoculação com *P. pachyrhizi*.

Gene	Valor da expressão gênica (RQ)					
	PI 230970 (Tolerante)			Embrapa-48 (Suscetível)		
	Fitotron 1	Fitotron 2	Fitotron 3	Fitotron 1	Fitotron 2	Fitotron 3
<i>Chib1-A</i>	117,32**	0,37*	2,19*	1,75**	6,60**	4,07**
<i>Gmchs1</i>	62,47**	48,41**	2,17**	26,21**	20,20**	0,41 ^{NS}
<i>PAL 1</i>	26,38**	2,43 ^{NS}	2,40*	18,02**	3,98*	1,48 ^{NS}
<i>Endogluc</i>	4,29*	7,80**	0,52 ^{NS}	38,93**	0,89 ^{NS}	0,19 ^{NS}
<i>SodB2</i>	2,96**	11,53*	0,42 ^{NS}	23,68**	0,80 ^{NS}	0,41 ^{NS}
<i>ARF</i>	0,90 ^{NS}	1,99 ^{NS}	0,21 ^{NS}	13,18**	0,42*	0,46 ^{NS}
<i>LOX7_5UTR</i>	1,76**	10,38**	0,02 ^{NS}	15,53**	1,21 ^{NS}	0,06 ^{NS}
<i>Sam22</i>	12,85**	1,25 ^{NS}	0,82 ^{NS}	1,44 ^{NS}	4,79**	3,32**
<i>Pgip3</i>	3,50**	5,11*	0,24 ^{NS}	16,89**	0,50*	0,22 ^{NS}

** - Valor significativo ao nível de 1%, calculado pelo teste t.

* - Valor significativo ao nível de 5%, calculado pelo teste t.

NS - não significativo.

6 - DISCUSSÃO

6.1 – Genes selecionados para a análise da quantificação relativa por PCR em tempo real, em soja, após inoculação do patógeno *P. pachyrhizi*

O reconhecimento do patógeno pela planta leva à indução de uma resposta de defesa que é controlada por inúmeros genes que estão envolvidos desde a detecção do patógeno até a resposta final. Em se tratando de um fungo, num primeiro contato com a planta, este poderia estar liberando poligalacturonases, que são enzimas que degradam a parede celular da planta, sendo uma possível estratégia de ataque do patógeno. Em contrapartida, uma estratégia de defesa da planta seria a produção de proteínas inibidoras de poligalacturonases – Pgip (*polygalacturonase-inhibiting protein*) e desta forma, inibir a atividade das poligalacturonases fúngicas (MAHALINGAM, WANG & KNAP, 1999). Sendo assim, *Pgip3* foi um dos genes que teve seus níveis de expressão avaliados neste trabalho.

Outras enzimas também atuam como barreiras iniciais à infecção, tais como, quitinases e β -1,3 glucanases, que hidrolisam a quitina e as β -1,3-glucanas, visto que os polímeros citados mostram-se como os principais constituintes da parede celular fúngica (MAUCH & STAEHELIN, 1989; GIJZEN, et al. 2001; BRAVO et al. 2003).

A infecção da planta por um patógeno pode desencadear a liberação de moléculas elicitoras, tanto da planta como do patógeno, que são capazes de ativar cascatas de transdução de sinais, que culminam

com a produção de espécies reativas de oxigênio, ácido salicílico, etileno, que constituem as principais moléculas sinalizadoras. Além disso, a resposta da planta à infecção pode levar à produção de fitoalexinas, que são compostos antimicrobianos que atuam de forma direta sobre o agressor, limitando o crescimento do patógeno. Enzimas tais como fenilalanina amônia liase e chalcona sintase, são compostos chave na rota das fitoalexinas (ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALAN, 1991; MORAN et al. 2003; TUTEJA, et al., 2003) e desde modo, também eleitas para terem seus níveis de expressão avaliados na presença de *P. pachyrhizi*.

O estresse causado pelo ataque do patógeno desencadeia a produção de radicais superóxido, em função da produção de espécies reativas de oxigênio na planta durante a HR. A presença desses compostos é tóxica para o tecido vegetal, de modo que em resposta à produção destes, há a expressão de enzimas superóxidos dismutases (SOD), que convertem rapidamente os radicais superóxidos a peróxido de hidrogênio, e assim protegem as células contra possíveis danos. A atividade de SOD com conseqüente produção de H₂O₂ é muito importante durante a resposta de defesa, uma vez que H₂O₂ pode atuar como molécula sinalizadora durante a infecção. Ele atua como substrato para peroxidação lipídica, que leva a produção de ácido jasmônico, um sinalizador, além da ativação de PAL. Contribui para reforço da parede celular (auxilia na formação de polímeros de lignina) e pode também ativar aumento na síntese de fitoalexinas, por meio da biossíntese de propanóides ou flavonóides, e ainda contribui para o aumento da

atividade da ácido benzóico hidroxilase, que leva a produção de ácido salicílico, outro sinalizador. Devido seu papel crucial na detoxificação espera-se que SOD seja ativada nas interações com *P. pachyrhizi*.

Outra enzima que poderia estar presente no mecanismo de defesa seria a lipoxigenase. Esta enzima atua na rota de produção do ácido jasmônico, que por sua vez é um ativador de mecanismos de resistência. Além do mais, a lipoxigenase poderia estar atuando também na rota das enzimas oxidativas, bem como na produção de moléculas antimicrobianas (SARAVITZ & SIEDOW, 1996).

Além desses genes, foi incluído um fator de ribosilação do ADP (ARF – *ADP-ribosylation factor*), que atua no controle do ciclo celular durante o desenvolvimento, e tem sido mostrado aumentar o nível do seu transcrito quando exposto a peróxido de hidrogênio e a moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico (LEE et al. 2003).

Completando a lista dos genes, foi escolhido um mensageiro associado à resposta a patógenos e injúrias; identificado em soja como *Sam22* (*Stress Associated Messages 22*), pertencente ao grupo das proteínas relacionadas à patogênese PR-10 (CROWELL et al. 1992).

6.2 – Quantificação relativa dos genes envolvidos no mecanismo de defesa da soja frente a *P. pachyrhizi*

Foi observado que o nível de expressão gênica entre os Fitotrons foi muito variável. Em função do baixo número de plantas com alto nível de infecção nos Fitotrons 2 e 3 (26,6% e 28,5%, respectivamente), os

dados obtidos a partir dos mesmos não serão discutidos. Serão discutidos mecanismos de defesa proposto com base no perfil encontrado no Fitotron 1, onde mais de 80% das plantas apresentaram alto nível de infecção.

Considerando um possível mecanismo de defesa proposto para a soja frente à ferrugem asiática, a expressão do gene *Chib1-A* seria um ponto chave no processo de defesa celular, sendo uma fonte efetiva de combate ao patógeno.

A quitinase caracteriza-se por ser uma enzima hidrolítica, que degrada a quitina, um polímero de ligação β , 1-4 de N-acetil-D-glucosamina (BISHOP, DEAN & MITCHELL-OLDS, 2000; BRAVO et al., 2003). Uma vez que a quitina é o principal componente da parede celular de fungos, genes relacionados à produção de quitinases são associados a vias de respostas de defesa da planta a estes patógenos.

VAN LOON (1997) propõe a localização das proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) quanto a sua característica ácida ou básica. As enzimas ácidas estariam localizadas no apoplasto, ao passo que as básicas predominantemente nos vacúolos. As proteínas localizadas no espaço intercelular estariam atuando como uma primeira linha de combate ao patógeno.

Chib1-A codifica uma quitinase em soja, pertencente ao grupo das PR-8. WATANABE et al. (1999), verificaram tratar-se de uma PR ácida, tendo sua expressão aumentada por etileno, respondendo também a ácido salicílico e ferimento, associando esta proteína a uma resposta de ataque patogênico.

A presença do patógeno *P. pachyrhizi* induziu um aumento na expressão desse gene em ambos os genótipos avaliados, no entanto, sua expressão foi mais intensa no genótipo tolerante (PI230970). Este perfil de expressão pode estar relacionado à rápida produção da quitinase, atuando com uma primeira linha de defesa, buscando reduzir a colonização do fungo. No genótipo suscetível essa expressão pode não ter sido tão efetiva, ou tardia. KHAN & SHIH (2004), trabalhando com morangos, também verificaram o aumento na indução de quitinases após inoculação com o fungo patogênico *Colletotrichum*, relacionando esse aumento à defesa celular. O mesmo foi observado por BLIFFELD et al. (1999), trabalhando com trigo.

Outra proteína que poderia estar atuando juntamente com a quitinase é a beta-1,3-endoglucanase. Esta proteína hidrolisa a ligação 1,3-β-D-glicosídica da parede celular dos patógenos, liberando oligossacarídeos glucans, que por sua vez podem elicitar a expressão gênica do hospedeiro (TAKEUCHI et al., 1990). Beta-1,3-endoglucanase pertence à classe III das glucanases de soja, sendo uma PR-Q de localização extracelular (JIN et al., 1999).

Apesar de quitinase e beta-1,3 endoglucanase terem sido expressos nos genótipos avaliados, o tempo e a intensidade de resposta pode ter sido o ponto-chave para contra-atacar a presença do fungo. No genótipo suscetível essa ativação pode também estar relacionada a uma maior colonização do fungo no tecido do hospedeiro, enquanto no tolerante (PI230970) esta resposta pode ter sido mais efetiva. Esta observação foi comprovada por VAN DE MORTEL et al. (2007), que

verificaram uma maior taxa de colonização de *P. pachyrhizi* na cultivar Embrapa-48, comparada com PI 230970.

MONTESANO, BRADER & PALVA (2003) relataram a atuação de elicitores na resposta de defesa a patógenos, observando que muitos deles estão constitutivamente presentes na parede celular do patógeno como componentes estruturais. O exemplo citado neste trabalho foi quitina e glucan, oligossacarídeos liberados pela degradação da parede celular fúngica (SHIBUYA & MINAMI, 2001, DAY et al., 2001).

Intensificando a resposta de defesa no genótipo tolerante, observou-se a expressão do gene *Sam22* (*Stress-associated message 22*). Este gene poderia estar limitar a propagação do patógeno no genótipo tolerante e assim minimizar os danos causados pela sua colonização.

CROWELL et al. (1992) demonstraram que este gene aumenta sua expressão em folhas de soja quando submetidas a ácido salicílico, ferimento e elicitores fúngicos. Este gene pertence ao grupo das PR-10, com domínio BetV1 (alergeno de *Betula verrucosa* – vidoeiro), e as proteínas codificadas se caracterizam pelo baixo peso molecular e acidez

CHADHA & DAS (2006) relataram que PR-10 possuidoras do domínio BetV1 poderiam promover uma interação com a membrana do fungo, e assim exerceria atividade RNase, limitando a propagação do mesmo. Além disso, ALKHAROUF, KHAN & MATTHEWS (2004) verificaram alto nível de transcritos de *Sam22* nas bibliotecas de soja infectada com nematóide do cisto, sugerindo uma contínua indução deste

gene. O mesmo autor verificou também a expressão de *Sam22* em bibliotecas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* (ALKHAROUF et al., 2005).

Muitos autores relatam que um primeiro mecanismo de ataque de fungos patogênicos seria a liberação de enzimas poligalacturonases (PG). Essas enzimas atuam clivando a ligação entre resíduos de ácido D-galaturônico, componentes da pectina - matriz de polissacarídeos da parede celular da planta (FAVARON et al., 1994; MAHALINGAM, WANG & KNAP, 1999; DE LORENZO & FERRARI, 2002).

Atuando também num mecanismo de retroalimentação das respostas de defesa, o gene *pgip3*, que codifica uma proteína inibidora de poligalacturonase, demonstrou ser diferencialmente expresso nos dois genótipos infectados por *P. pachyrhizi*, comparado com os mesmos genótipos não inoculados. O alto nível de expressão observado no genótipo suscetível pode ser atribuído a uma maior colonização do patógeno no tecido hospedeiro, uma vez que este não apresenta barreiras efetivas ao crescimento do patógeno, o que pode ser confirmado pela formação das lesões tipo TAN neste genótipo. Assim, novas células foram parasitadas, o que poderia desencadear uma maior ativação e conseqüente acúmulo do transcrito. No genótipo tolerante, a resposta de defesa logo no início da infecção, restringindo o acúmulo e a taxa de colonização do patógeno levaria a uma expressão mais pontual de *pgip3*, e, conseqüentemente um menor acúmulo do transcrito. Uma expressão tardia desse gene poderia também estar contribuindo para a propagação do patógeno no hospedeiro suscetível.

Proteínas Inibidoras de Poligalacturonases (PGIPs) são induzidas em estágios iniciais de infecção, e atuam sobre as poligalacturonases, retardando o seu modo de atuação (DE LORENZO & FERRARI, 2002).

Ao degradar a parede celular da planta, as poligalacturonases liberam oligômeros, chamados oligogalacturonases (OGs), que funcionam como elicitores ativando mecanismos de defesa. Porém os mesmos são inativados pela ação das PGs. As PGIPs por sua vez aumentariam o tempo de ação dos oligômeros, por limitar a ação das poligalacturonases, permitindo dessa forma que os elicitores ativassem respostas de defesa por mais tempo (GOMATHI & GNANAMANICKAM, 2004).

FAVARON (1994) trabalhando com PGIP de soja verificou diferenças na habilidade de inibição de *pgip3* contra poligalacturonases de *Sclerotinia sclerotiorum*, atribuindo a diferenças na estruturas das PGs, incluindo o sítio de ligação para PGIP. D'ÓVIDIO (2006) verificou a atividade antifúngica de *pgip3*, comparado às outras três PGIPs de soja.

Considerando que *P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico, necessitando, portanto, de células vivas do hospedeiro, a atuação das poligalacturonases estariam relacionadas a uma leve maceração da parede celular, atuando sobre a pectina, porém não a degradando totalmente, o que poderia levar à destruição da célula. O mesmo foi observado por SIMONS et al. (2005), trabalhando com fungo biotrófico *Cymadothea trifolii*, em folhas de *Trifolium* spp.

Concomitante à liberação de elicitores pela ação de quitinase, endoglucanase e inibidor de poligalacturonases, respostas de defesa como a produção de fitoalexinas pôde ser observada nos dois genótipos.

Fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular produzidos pela planta em resposta a infecção ou estresse (DARVILL & ALBERSHEIM, 1984). Fenilalanina amonia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS) são duas enzimas chave que estão envolvidas na biossíntese de fenilpropanóides - fitoalexinas (ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALAN, 1991).

Em presença do fungo *P. pachyrhizi*, os dois genótipos, PI 230970 e Embrapa-48 apresentaram aumento na expressão para esses dois genes. Uma vez que estes genes estão envolvidos na rota de biossíntese de fitoalexinas, a soja poderia responder à presença do patógeno produzindo estes compostos antimicrobianos. VAN DE MORTEL et al. (2007) apresentaram o perfil de expressão de genes relacionados à biossíntese de flavonóides (fitoalexinas) na interação soja - *P. pachyrhizi*, utilizando a cultivar Embrapa-48 e o genótipo PI 230970. Os autores demonstraram que nos estágios iniciais da infecção a expressão desses genes aumenta em ambos os genótipos, retornando ao nível do falso inoculado por volta de 24 horas após infecção. Num estágio tardio da infecção observou-se um aumento novamente na expressão desses genes, porém com um perfil diferenciado entre os genótipos, sendo ao menos 1 dia mais cedo no genótipo PI 230970.

HAHN (1996) observou que mesmo sendo capazes de sintetizar fitoalexinas, algumas plantas podem fazer de maneira lenta, permitindo que o microrganismo prolongue sua infecção antes que haja o acúmulo dessas substâncias em quantidade suficiente para inibi-lo. Segundo HAMMERSCHMIDT (1999) a atuação das fitoalexinas como componentes

de defesa ou simplesmente como uma resposta à infecção pode ocorrer, uma vez que respostas diferenciadas podem ser observadas nas interações planta-patógeno.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) também são produzidas em resposta à presença de patógenos no tecido hospedeiro, podendo ser ativada, também, por estresses como seca, salinidade, temperatura, entre outros. Enzimas como NADPH oxidase, amina oxidase e peroxidases, atuam na produção de intermediários reativos de oxigênio; radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (HO^*) são representantes das ROS (MILTTLER, 2002).

O aumento na produção de ROS e o seu acúmulo dentro da célula podem ocasionar danos oxidativos aos componentes celulares, o que pode culminar em morte celular no sítio da infecção (HEATH, 1998; MITTLER, 2002; ALSCHER, ERTUK & HEATH, 2002; ARORA, SAIRAM & SRIVASTAVA, 2002).

Superóxido Dismutase (SOD) constitui-se como linha de defesa contra a produção de intermediários reativos de oxigênio (ALSCHER, ERTURK & HEATH, 2002). Ele catalisa a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio atmosférico, prevenindo danos oxidativos no organismo (MORAN et al., 2003).

Ambos os genótipos inoculados com *P. pachyrhizi* aumentaram a expressão de SOD, no entanto a expressão no genótipo tolerante não foi tão intensa quanto no genótipo suscetível. Esse perfil de expressão poderia proporcionar um maior acúmulo de radicais superóxido na célula

de PI230970 inoculado, o que poderia levar à ativação de respostas de defesa, em função dos danos oxidativos ocorridos dentro da célula. A expressão de SOD no genótipo suscetível poderia estar relacionada a uma maior re-infecção de células do hospedeiro.

A produção de espécies reativas de oxigênio poderia estar relacionada com a ativação da lipoxigenase. Esses intermediários reativos de oxigênio poderiam atuar como bioativadores de derivados de ácidos graxos. Peróxido de hidrogênio poderia atuar como um substrato para a produção de ácido jasmônico pela lipoxigenase, a partir de ácido linoléico da membrana plasmática (DIXON & HARISSON, 1994). SARAVITZ & SIEDOW (1996) demonstraram que a expressão do gene *lox7* em soja aumenta em resposta a ferimento. A presença do fungo *P. pachyrhizi* poderia estar induzindo a expressão da lipoxigenase, em resposta à colonização do tecido hospedeiro.

Outro efeito exercido pelos intermediários reativos de oxigênio produzidos no genótipo recessivo seria a expressão do gene *ARF1* que codifica para um fator de ribosilação do ADP (Adenosina Difosfato), representando uma subfamília de proteínas de ligação ao GTP (Guanosina Trifosfato) (REGAD et al., 1993; MOLENDIJK, RUPERTI & PALME, 2004). São proteínas bem caracterizadas em mamíferos, e em plantas têm sido relatadas como importantes no transporte através da membrana celular, bem como controle do ciclo celular, alteração da composição de lipídeos da membrana e remodelagem de compartimentos celulares (LEE et al., 2003; VERNOUD et al., 2003).

Foi observado um aumento de expressão desse gene somente no genótipo suscetível, possivelmente em decorrência da produção de intermediários reativos de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, por exemplo, que pode ter atuado com o sinalizador para a expressão de transcritos *ARF*. Possivelmente a produção desses elicitores pode ter ocorrido devido a uma maior colonização do patógeno. LEE et al., (2003) verificaram que células de arroz tratadas com peróxido de hidrogênio apresentavam um aumento na expressão de *ARF*, o mesmo acontecendo quando era aplicado ácido salicílico. Porém, a participação de *ARF* no mecanismo de defesa celular precisa ser mais bem elucidada.

7 – CONCLUSÃO

Os genes analisados neste trabalho apresentaram expressão diferenciada quando em presença do patógeno *P. pachyrhizi*.

Considerando que os genes estudados estão envolvidos em diferentes mecanismos de defesa, isto demonstra o quão complexo é a interação entre eles e o quão diversificado é o mecanismo molecular de defesa da planta frente à ferrugem asiática da soja.

A partir da análise do perfil de expressão desses genes, estudos mais aprofundados das rotas de defesa analisadas deverão ser realizados, com o objetivo de identificar genes mais específicos no processo de defesa celular, na interação soja - *P. pachyrhizi*, e assim possibilitar o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes, ou resistente ao patógeno.

8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os mecanismos de defesa que uma planta apresenta frente ao ataque de um patógeno envolvem a participação de muitos genes através de cascatas de reações. A identificação de uma rota de defesa pode possibilitar o estudo mais aprofundado da mesma, com o objetivo de identificar genes mais específicos no processo de defesa celular e apontar novas alternativas para obtenção de cultivares resistente.

A fim de testar as hipóteses levantadas na discussão deste trabalho, quanto à resposta de soja à infecção por *P. pachyrhizi*, a montagem de um novo experimento será importante para confirmação dos dados obtidos.

Foi verificado que a condução dos experimentos em Fitotron foi eficiente no controle do surgimento de outras doenças além da ferrugem asiática da soja. Numa primeira tentativa de condução do mesmo experimento em casa de vegetação isso não ocorreu, onde foram observadas lesões nas folhas ocasionadas por outros microrganismos além de *P. pachyrhizi*. No entanto, baseado nas grandes variações dos resultados entre os Fitotrons, uma proposta diferente para condução do experimento precisa ser apresentada. Foi observado que o número de vasos dentro do Fitotron estava muito elevado, em função do número de genótipos utilizados e espaço disponível, ocasionando uma densidade elevada dentro da sala climatizada. Além disso, o número de plantas em relação ao tamanho do vaso também pode não ter sido adequado. A redução no número de plantas e de genótipos poderia minimizar esses

fatores. Outro ponto importante seria o aumento da unidade experimental, utilizando folhas de todas as plantas de cada vaso, para a extração do RNA. A análise da expressão gênica dentro dos horários de coleta também possibilitará confrontar com maior precisão os dados obtidos.

9 - REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press. 5 ed. 2004.
- ALKHAROUF, N.; KHAN, R. & MATTHEWS, B. Analysis of expressed sequence tags from roots of resistant soybean infected by the soybean cyst nematode. **Genome**, v.47, p.380-388, 2004.
- ALKHAROUF, N., CHOI, J.J., FREDERICK, R.D., MATTHEWS, B.F. Gene expression changes in soybean after infection with soybean rust (*P. pachyrhizi*) [abstract]. **BARC Poster Day**. Paper No. 09. 2005.
- ALVES, S.A.M; FURTADO, G.Q. E BERGAMIN FILHO, A. Influencia das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. p.37-59, 2006.
- ALSCHER, R.G.; ERTUK, N. & HEATH, L.S. Role of Superoxide Dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n°372, p.1331-1341, 2002.
- ANDRADE, P.J.M. & ANDRADE, D.F.A.A. **Controle Químico da Ferrugem Asiática da Soja**. In Ferrugem Asiática da Soja. Editor: Laércio Zambolim. p.61-72, 2006.
- ARIAS, C.A.A.; RIBEIRO, A.S.; YORINORI, J.T.; BROGIN, R.L.; OLIVEIRA, M.F.; TOLEDO, J.F.F. Inheritance of resistance of soybean to rust (*P. pachyrhizi* sidow). In: **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.**, Foz do Iguaçu, PR, Anais... p.100, 2004.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K. & SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v.82, n°.10, p.1227-1238, 2002.
- BACCHI, M.A.L. & KRUGNER, T.L. FUNGOS. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p-46-96, 1995.
- BARBER, M.S.; BERTRAM, R.E. & RIDE, J.P. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.34, p.3-12, 1989.
- BEDENDO, I.P. Vírus. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.132-160, 1995a.
- BEDENDO, I.P. Protozoários. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.161-167, 1995b.
- BERTRAND, J.; LAURENT, C. & LECLERCQ, V. **O mundo da Soja**. São Paulo:HUCITEC. 139p, 1987.

- BISHOP, J.G.; DEAN, A.M. & MITCHELL-OLDS, T. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. **PNAS**, v.97, n°.10, p.5322-5327, 2000.
- BLIFFELD, M.; MUNDY, J.; POTRYKUS, I. & FUTTERER. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. **Theor. Appl. Genet.**, v.98, p.1079-1086, 1999.
- BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 61p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 21) 1987.
- BONDE, M.R., NESTER, S.E., BERNER, D.K., FREDERICK, R.D. Effects of temperature on initiation of infection in soybean by isolates of *P. pachyrhizi* and *p. meibomiae*. **American Phytopathology Society**. v.96, 2006.
- BONETTI, L.P. Distribuição da Soja no Mundo. Origem, História e Distribuição. p. 1-6 In: **A Soja no Brasil**. Editores: Shiro Miyasaka e Júlio César Medina. 1981.
- BRAVO, J.M.; CAMPO, S.; MURILLO, I.; COCA, M. & SEGUNDO, B.S. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.745-759, 2003.
- BROMFIELD, K. R. **Soybean Rust**. Monograph 11. The american phytopathological society. 1982.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.470-493, 1995.
- CARVALHO FILHO, A. & AMABILE, R. F. Biologia da Soja. In: **Soja: Suas Aplicações**. (Moraes, A. A. C. & da Silva, A. L.). Rio de Janeiro: MEDSI. 259p. 1996.
- CARVALHO JUNIOR, A.A. & FIGUEREDO, M.B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.197-200, 2000.
- CHADHA, P. & DAS, R.H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. **Planta**, v.225, p.213-222, 2003.
- CONAB, 2005.
<http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17>
> Disponível em 7 de março de 2007.

- CONAB, 2007a.
<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/indicadores/0204_export_complexo_soja_e_trigo.pdf> Disponível em 10 de maio de 2007.
- CONAB, 2007b.
<<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>>
Disponível em 10 de maio de 2007.
- COSTA, J. A. **Cultura da Soja**. Porto Alegre: I. Manica, J. A. Costa, 233p. 1996.
- COSTAMILAN, L.M., BERTAGNOLLI, P.F. & YORINORI, J.T. Avaliação de danos em soja causados por ferrugem asiática. In: **REUNIÃO SUL DE SOJA DA REGIÃO SUL, 30.**, Cruz Alta, RS. Anais... p.99, 2002.
- CROWELL, D.N.; JOHN, M.E.; RUSSELL, D. & AMASINO, R.M. Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean. **Plant Molecular Biology**, v.18, p-459-466, 1992.
- DALL'AGNOL, A. Current status of soybean production and utilization in Brazil. In: **Proceedings of VII World Soybean Research Conference**. (Moscardi, F. et al. editors) Londrina: Embrapa Soybean, 2004.
- DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors – A Defense Against Microbial Infection in Plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.35, p.243-75, 1984.
- DAY, R.B.; OKADA, M.; ITO, Y.; TSUKADA, K.; ZAGHOUBANI, H.; SHIBUYA, N. & STACEY, G. Binding Site for Chitin Oligosaccharides in the Soybean Plasma Membrane. **Plant Physiology**, v.126, p.1162-1173, 2001.
- DE LORENZO, G. & FERRARI, S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, p.1-5, 2002.
- DESLANDES, J.A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.337-339, 1979.
- DIXON, R.A. & HARISSON, M.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopatology**, v.32, p.479-501, 1994.
- D'OVÍDIO, R.; ROBERTI, S.; DI GIOVANNI, M.; CAPODICASA, C.; MELARAGNI, M.; SELLA, L.; TOSI, P. & FAVARON, F. The characterization of the soybean polygalacturonase-inhibiting proteins

- (Pgip) gene family reveals that a single member is responsible for the activity detected in soybean tissues. **Planta**, v.224, p.633-645, 2006.
- EMBRAPA-SOJA, 2006a. Disponível em
<http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=146&cultura=1>. Acesso em 20 de novembro de 2006.
- EMBRAPA-SOJA, 2006b. Disponível em
<http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=299&cod_pai=171>. Acesso em 26 de fevereiro de 2007.
- EMBRAPA-SOJA, 2007a. Disponível em
<<http://tamboril.cnpso.embrapa.br/alerta/anteriores.php>> Acesso em 9 de maio de 2007.
- EMBRAPA-SOJA, 2007b. Disponível em
<http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=380> Acesso em 20 de maio de 2007.
- EMBRAPA-SOJA, 2007c. Disponível em
<http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=160> Acesso em 5 de junho de 2007.
- EMBRAPA-SOJA, 2007d. Disponível em
<www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=145&cultura=1> Acesso em 11 de julho de 2007.
- 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., ALMÉRAS, E. & KRISHNAMURTHY, V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.372–378, 2003.
- FAVARON, F.; D`OVIDIO, R.; PORCEDDU, E. & ALGHISI, P. Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. **Planta**, v.195. p.80-87, 1994.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Techonology, 1977. 11p.
- FLOR, H. H. Current status of gene-a-gene concept. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.9, p. 275-296, 1971.
- FRY, W.E. **Principles of Plant Disease Management**. New York: Academic Press. 378p, 1982.
- GIJZEN, M.; KUFLU, K.; QUTOB, D. & CHERNYS, J.T. A class I chitinase from soybean seed coat. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n°, 365, p.2283-2289, 2001.

- GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis — 2001 status. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.301–308, 2001.
- GOMATHI, V. & GNANAMANICKAM, S.S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. **Current Science**, v.87, n°9, p.1211-1217, 2004.
- GOMES, P. **A soja**. – 5 ed. – São Paulo, 149p, 1986.
- HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptor in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.
- HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? **Annual Review Phytopathology**. v.37, p.285-306, 1999.
- HARRAR, J.G. e STACKMAN, E.C. **Principles of Plant Pathology**. New York: The Ronald Press Company. 581p, 1957.
- HARTING, E.E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. **Crop Science**, v.26, p.1135-1136, 1986.
- HEATH, M.C. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.117–124, 1998.
- HENNING, A.A. & GODOY, C.V. Situação da Ferrugem da Soja no Brasil e no Mundo. In **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. p.1-14, 2006.
- HOOVER, A.L. & SAXENA, K.M.S. Genetics of disease resistance in plants. **Annual Review of Genetics**. v.5, p.407-424, 1971.
- IBGE, 2007. Disponível em
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>> Acesso em 22 de julho de 2007.
- JIN, W.; HORNER, H.T.; PALMER, R.G. & SHOEMAKER, R.C. Analysis and Mapping of Gene Families Encoding β -1,3-Glucanases of Soybean. **Genetics**, v.153, p.445-452, 1999.
- HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v.24, p.408-421, 1970.
- KHAN, A.A. & SHIH, D.S. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant. **Plant Science**, v.166, p.753-762, 2004.

- KIRIK, V., BOUYER, D., SCHÖBINGER, U., BECHTOLD, N., HERZOG, M., BONNEVILLE, J. M., & HÜLSKAMP, M. CPR5 is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. **Current Biology** v.11, p.1891–1895, 2001.
- KITAJIMA, S. & SATO, F. Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. **Journal of Biochemistry**. v.125 p. 1-8, 1999.
- KOCHMAN, J.K. The effect of temperature on development of soybean rust (*P. pachyrhizi*). **Australian Journal of Agricultural Research** v.30, p.273–277, 1979.
- KRUGNER, T.L. A Natureza da Doença. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.34-45, 1995.
- LEE, W.Y.; HONG, J.K.; KIM, C.Y.; PARK, H.C.; KIM, J.C.; YUN, D.; CHUNG, W.C.; LEE, S.; LEE, S.Y.; CHO, M.J. & LIM, C.O. Over-expressed rice ADP-ribosylation factor 1 (RARF1) induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tobacco plants. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.573-581, 2003.
- LEITE, B. & PASCHOLATI, S.F. Hospedeiro: Alterações Fisiológicas Induzidas por Fitopatógenos. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.393-416, 1995.
- LEVY, C. Zimbabwe – a country report on soybean rust control. In: **Proceedings of VII World Soybean Research Conference**. (Moscardi, F. et al. editors) Londrina: Embrapa Soybean, 2004.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001
- MAHALINGAM, R; WANG, G. & KNAP, H.T. Polygalacturonase and Polygalacturonase Inhibitor Protein: Gene Isolation and Transcription in *Glycine max* - *Heterodera glycines* Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n°.6, p.490-498, 1999.
- MARTIN, J.T. Role of cuticle in the defense against plant disease. **Annual Review of Phytopathology**. v.2, p.81-100, 1964.
- MAUCH, F. & STAEHELIN, A. Functional Implications of the subcellular Localization of Ethylene-Induced Chitinase and β -1,3-Glucanase in Bean Leaves. **The Plant Cell**, v.1, p.447-457, 1989.
- McLEAN, R.J. & BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*P. pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal Agriculture Research**, v.31, p.951-956, 1980.

- MELCHING, J.S.; DOWLER, W.M.; KOOGLE, D.L.; ROYER, M.H. Effects of durations, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant Disease**, v.73, p.117-122, 1989.
- MILTTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n°9, p.405-410, 2002.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007a. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 7 de março de 2007.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007b. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 10 de maio de 2007.
- MOLENDIJK, A.J.; RUPERTI, B. & PALME, K. Small GTPases in vesicle trafficking. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.694–700, 2004.
- MONTEIRO, A.R. & FERRAZ, L.C.C.B. Nematóides. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p-168-201, 1995.
- MONTESANO, M.; BRADER, G. & PALVA, E.T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p-73-79, 2003.
- MORAES, A. A. C.; SILVA, A. L.; CARVALHO FILHO, A. & AMABILE, R. F. Histórico da Soja. In: **Soja: Suas Aplicações**. (Moraes, A. A. C. & da Silva, A. L.). Rio de Janeiro: MEDSI. 259p. 1996.
- MORAN, J.F.; JAMES, E.K.; RUBIO, M.C.; SARATH, G.; KLUCAS, R.V. & BECANA, M. Functional Characterization and Expression of a Cytosolic Iron-Superoxide Dismutase from Cowpea Root Nodules. **Plant Physiology**, v.133, p.773-782, 2003.
- MYSORE, K. S. & RYU, C. Nonhost resistance: how much do we know? **Plant Science**. v.9, p.97-104, 2004
- ONO, Y.; BURITICÁ, P. & HENNEN, J.F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycol. Res.** 96, v.10, p. 825-850, 1992.
- PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Hospediro: Mecanismos de Resistência. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.417-454, 1995.
- REGAD, F.; BARDET, C.; TREMOUSAYGUC, D.; MOISAN, A.; LESCURE, B. & AXELOS, M. cDNA cloning and expression of an *Arabidopsis* GTP-binding protein of the ARF family. **FEBS**, v.316, n°.2, p.133-136, 1993.

- SALGADO, C.L. e FERREIRA, L.P. Bactérias. In: **Manual de Fitopatologia**. (Bergamin Filho, Kimati & Amorin) São Paulo: Ceres, p.97-131, 1995.
- 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.
- SIMONS, U.K.; BAUER, R.; RIOUX, D.; SIMARD, M. & OBERWINKLER, F. The intercellular biotrophic leaf pathogen *Cymadothea trifolii* locally degrades pectins, but not cellulose or xyloglucan in cell walls of *Trifolium repens*. **New Phytologist**, v.165, p.243-260, 2005.
- SINGH, K.B, FOLEY, R. C. & OÑATE-SANCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.430–436, 2002.
- SHIBUYA, N. & MINAMI, E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.223-233, 2001.
- SHOEMAKER, R.C., POLZIN, K., LABATE, J., SPECHT, J., BRUMMER, E.C., OLSON, T., YOUNG, N.D., CONCIBIDO, V.C., WILCOX, J., TAMULONIS, J.P., KOCHERT, G. & BOERMA, H.R. Genome Duplication in Soybean (Glycine Subgenus Soja). **Genetics** 144:329-338, 1996.
- TAKEUCHI, Y.; YOSHIKAWA, M.; TAKEBA, G.; TANAKA, K.; SHIBATA, D. & HORINO, O. Molecular Cloning and Ethylene Induction of Mrna Encoding a Phytoalexin Elicitor-Releasing Factor, β -1,3-Endoglucanase, in Soybean. **Plant Physiology**, v.93, p.673-682, 1990.
- THEVISSSEN, K., TERRAS, F. R. G., BROEKAERT, W. F. Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5451–5458, 1999.
- USDA, 2007. Disponível em
<<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1183665>>
Acesso em 26 de fevereiro de 2007.
- 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. **MPMI**, v.20, n°.8, p.887-899, 2007.

- VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.
- VAN LOON, L.C & STRIEN, E.A.V. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v.55, p.85-97, 1999
- VERNOUD, V.; HORTON, A.C.; YANG, Z. & NIELSEN, E. Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.131, p.1191–1208, 2003.
- WATANABE, A.; NONG, V.H.; ZHANG, D.; ARAHIRA, M.; YEBOAH, N.A.; UDAKA, K. & FUKAZAWA, C. Molecular Cloning and Ethylene-Inducible Expression of *Chb1* Chitinase from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.63, n°.2, p.251-246, 1999.
- WIKIPEDIA, 2007. Fabaceae. <<http://en.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>>. Disponível em 9 de julho de 2007.
- WENDEHENNE, D., DURNER, J. & KLESSIG, D.F. Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense response. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.449–455, 2004.
- YORINORI, J.T. A country report and rust control strategies in Brazil. In: **Proceedings of VII World Soybean Research Conference**. (Moscardi, F. et al. editors) Londrina: Embrapa Soybean, 2004.
- 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.
- YORINORI, J. T. A Ferrugem "Asiática" da Soja no Continente Americano: Evolução, Importância Econômica e Estratégias de Controle. **I Workshop Brasileiro sobre a ferrugem asiática**. Uberlândia: EDUFU p.21-37, 2005.
- ZAMBENEDETTI, E. B. **Preservação de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow e aspectos epidemiológicos e ultraestruturais da sua interação com a soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Lavras: UFLA, 95 p, 2005.
- ZAMBOLIM, L. Manejo Integrado da Ferrugem Asiática da Soja. In **Ferrugem Asiática da Soja**. Editor: Laércio Zambolim. p.73-98, 2006.