

VANESSA DE ALMEIDA BARROS

VIAS DE SINALIZAÇÃO MEDIADAS POR ÁCIDO SALICÍLICO E METIL-JASMONATO E PAPEL DE GmbZIP89 EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Phakopsora pachyrhizi* EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE SOJA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

B277v
2016
Barros, Vanessa de Almeida, 1990-
Vias de sinalização mediadas por ácido salicílico e metil-jasmonato e papel de GmbZIP89 em resposta à infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos contrastantes de soja / Vanessa de Almeida Barros. - Viçosa, MG, 2016.

vi, 32f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Luciano Gomes Fietto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.29-32.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. *Phakopsora pachyrhizi*. 3. Ácido salicílico. 4. Metil-jasmonato. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

VANESSA DE ALMEIDA BARROS

VIAS DE SINALIZAÇÃO MEDIADAS POR ÁCIDO SALICÍLICO E METIL-JASMONATO E PAPEL DE GmbZIP89 EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Phakopsora pachyrhizi* EM GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE SOJA

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

APROVADA: 09 de setembro de 2016.

Murilo Siqueira Alves
(Coorientador)

Pedro Augusto Braga dos Reis

Cléberon Ribeiro

Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela minha formação acadêmica até aqui, a qual me orgulho muito, pela estrutura de qualidade e por todas as oportunidades concedidas.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao meu pai, Tadeu, pelo apoio e compreensão do longo tempo fora de casa. À minha mãe por ter me ensinado o que há de bom no ser humano e mostrar o tamanho do seu amor até nos momentos mais difíceis. Foi dele que eu tirei força pra concluir esse trabalho, essa conquista é pra você (Força, mãe!). À minha irma, Beatriz, que pela sua presença, torcida e apoio tornou esse semestre mais leve.

Ao meu orientador, Luciano, por ter me dado a oportunidade de iniciar no mundo árduo e lindo da ciência e de ter aprendido tanto esses anos no laboratório. Obrigada pela compreensão, paciência e confiança.

Aos meus co-orientadores Murilo e o professor Maxmiller. Um agradecimento especial ao Max por toda a disponibilidade nessa reta final.

Aos membros da banca pela contribuição com esse trabalho.

À professora Claudine por ter cedido o espaço para meus experimentos.

Ao meu namorado, Daniel, pelo carinho e paciência incansáveis. Obrigada por ter me acalmado nos dias de desespero. Seu cuidado e seu apoio diário foram fundamentais para conclusão desse trabalho.

Aos meus amigos da vida e de república, os amores que Viçosa me deu. Obrigada por terem feito de Viçosa um lugar maravilhoso, por todos os momentos ímpares que passamos juntos e por terem me abraçado nas horas mais difíceis.

Ao Vôlei LUVÉ por ter garantido minha saúde mental até o fim do mestrado.

Às meninas da soja, principalmente a Amanda, Patrícia e Silvana, pelo conhecimento que me trouxeram, pela ajuda e disponibilidade de sempre e por tornarem o ambiente de trabalho um lugar agradável. Amanda e Paty, obrigada por terem me acompanhado de perto durante o mestrado, desde cada planta que transplantamos até a conclusão desse trabalho; por terem me dado a certeza de que ia ter dissertação mesmo que tudo desse errado e por terem sido as melhores motoristas de carrinho de mão que a casa de vegetação já teve, vou sentir uma falta de vocês! “Cês são boas demais pra mim”.

Ao pessoal do LBM, inclusive aos que já deixaram o laboratório, obrigada pela convivência e ajuda durante todos esses anos.

Aos meus professores da graduação e do mestrado, espero um dia conseguir ensinar como muitos de vocês me ensinaram.

À todos que tiveram alguma participação para a realização desse trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Phakopsora pachyrhizi e a ferrugem asiática	3
2.2. Sistemas de defesa em plantas	5
2.3. Fatores de transcrição bZIP e GmbZIP89.....	7
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivos específicos	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. Avaliação da concentração ideal de amplificação e teste de eficiência dos oligonucleotídeos	11
4.2. Tratamento com fitohormônios	13
4.3. Infecção com Phakopsora pachyrhizi	13
4.4. Extração de RNA e síntese de cDNA para qPCR.....	13
4.5. PCR em Tempo Real (qRT-PCR) e análises estatísticas	14
5. RESULTADOS	15
5.1. Análise da eficiência e concentração ideal dos oligonucleotídeos utilizados.....	15
5.2. Avaliação da expressão do gene GmbZIP89 e de genes marcadores em resposta à aplicação exógena de fitohormônios.....	16
5.3. Análise da expressão de GmbZIP89 e de genes envolvidos na via mediada por SA e JA em resposta a infecção por P. pachyrhizi	17
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	27
8. REFERÊNCIAS	29

RESUMO

BARROS, Vanessa de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. **Vias de sinalização mediadas por ácido salicílico e metil-jasmonato e papel de GmbZIP89 em resposta à infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos contrastantes de soja.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa e Murilo Siqueira Alves.

Uma resposta de defesa efetiva contra patógenos depende de uma grande reprogramação gênica, regulada principalmente por fatores de transcrição. Várias famílias de fatores de transcrição estão ligadas à resposta da planta ao ataque de patógenos e entre elas está a família bZIP (Basic Leucine Zipper). O transcritor GmbZIP89 é diferencialmente expresso durante a infecção de *P. pachyrhizi* em soja, o fungo biotrófico causador da ferrugem asiática. Esse fator possui alta similaridade com G/HBF-1 responsivo à estresse bióticos e GmbZIP105 responsivo à *P. pachyrhizi*. Isso sugere que GmbZIP89 possa estar envolvido na resposta a ferrugem asiática. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel de GmbZIP89 e da sinalização hormonal durante a infecção por *P. pachyrhizi* em soja. Mostramos que no início de infecção ocorre uma resposta via jasmonato (JA) e etileno (ET), seguida da sinalização via ácido salicílico (SA) e em estágios tardios ocorre a indução de resposta via JA. Supomos que TGA2 e ORA59 estejam envolvidos no crosstalk JA/SA durante a infecção. SA pode induzir a expressão de TGA2 e inibir a expressão de ORA59 comprometendo a indução de genes responsivos a JA. Mostramos que nos estágios iniciais e tardios de infecção, *P. pachyrhizi* mimetiza o ataque de um patógeno necrotrófico, elicitando resposta mediada por JA. Efeitos secretados pelo fungo provavelmente levam a regulação transcricional de JAZ1 e COI1, mediando a ativação da resposta via JA. Esses efeitos também parecem modular a expressão de GmbZIP89 que pode atuar na ativação de genes responsivos a JA ou na repressão transcricional de genes responsivos a SA, em ambos os casos inibindo a defesa mediada por SA. A inibição da resposta via SA garante uma grande vantagem adaptativa para o fungo, pois impede a morte celular decorrente da ativação da via. A manutenção da integridade do tecido foliar é crucial para patógenos biotróficos que necessitam de tecido vivo para obtenção de nutrientes e, dessa forma, é crucial para a colonização e disseminação de *P. pachyrhizi*.

ABSTRACT

BARROS, Vanessa de Almeida, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, September, 2016. **Signaling pathways mediated by salicylic acid and methyl jasmonate and the role of GmbZIP89 in response to Phakopsora pachyrhizi infection in contrasting soybean genotypes.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa and Murilo Siqueira Alves.

An effective defense response against pathogens depends on a wide genetic reprogramming, regulated mainly by transcription factors. Several transcription factors' families are linked to the plant's response to the attack of pathogens and among them there is the bZIP family (Basic Leucine Zipper). The transfactor GmbZIP89 is differentially expressed during a *Phakopsora pachyrhizi*, the biotrophic fungus responsible for causing asian rust infection on soybean. This factor is highly similar to G/HBF-1 responsive to biotic stress and GmbZIP105 responsive to *P. pachyrhizi*. This suggests that GmbZIP89 could be involved in the response to asian rust. This project aims to investigate the role of GmbZIP89 and hormone signaling during a *P. pachyrhizi* infection on soybean. We showed that at the beginning of the infection there is a response through jasmonate (JA) and ethylene (ET) followed by the signaling through salicylic acid (SA) and during later stages of the infection there is an induction of response through JA. We suppose that TGA2 and ORA59 are involved on JA/SA crosstalk during the infection. SA might induce TGA2's expression and inhibit ORA59's expression compromising the induction of genes, which are responsive to JA. We showed that during early and later infection stages, *P. pachyrhizi* mimics a necrotrophic pathogen's attack, eliciting JA mediated responses. Effectors secreted by the fungus probably result in the transcriptional regulation of JAZ1 and COI1, mediating the activation of a response through JA. These effectors also seem to modulate GmbZIP89 expression, which might act in the activation of genes that are responsive to JA or in the transcriptional repression of SA-responsive genes, in both cases compromising the induction of the SA-dependent defense. The inhibition of the SA signaling guarantees a great adaptive advantage to the fungus because it ceases cell death arising from SA pathway signaling. The maintenance of foliar tissue integrity is crucial to biotrophic pathogens that require live tissue to obtain nutrients and thus allow *P. pachyrhizi* colonization and spread.

1 – INTRODUÇÃO

Estresses bióticos (causados por patógenos, tais como vírus, bactérias, fungos, oomicetos, pragas e herbivoria) causam grandes perdas de produtividade na agricultura mundial (Sree et al, 2015). Um exemplo no Brasil é a ferrugem asiática da soja, que tem como agente causador o fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*. A primeira constatação da ferrugem asiática em lavouras de soja no Brasil ocorreu na safra 2001/02 e rapidamente espalhou-se pelas principais regiões produtoras do país. Desde sua introdução no Brasil, a doença custou para o país mais de US\$ 10 bilhões (Langenbach et al, 2016). Embora estresses bióticos sejam uma grande ameaça à produção agrícola, as plantas, por sua vez, desenvolveram mecanismos sofisticados para perceber o ataque de patógenos e traduzir essa percepção em uma resposta adaptativa (Liao et al, 2008).

Para que ocorra uma resposta efetiva contra determinado estresse, vários genes devem ser ativados e vários outros devem ser reprimidos, consequência de uma grande reprogramação gênica (Sre et. al, 2016). Neste contexto, destaca-se a função dos fatores de transcrição, proteínas regulatórias do processo de transcrição que atuam ativando ou inibindo a expressão de vários genes ao mesmo tempo, mediando uma resposta adaptativa da planta. Por esse motivo os fatores de transcrição entre os principais alvos para o aumento da tolerância a estresses (Latchman, 2010; Singh et al, 2002).

A família de fatores de transcrição que apresentam o domínio zíper de leucina básico (bZIP) é relacionada a diversos processos fisiológicos nas plantas, incluindo a resposta a estresses bióticos, que ainda é muito pouco estudada (Alves et al, 2013). Dentre os genes diferencialmente expressos durante a infecção de *P. pachyrhizi* em soja encontra-se o fator de transcrição bZIP89 pertencente à família bZIP (Soares, 2010). Existe uma correlação positiva entre similaridade de sequência e função (Pinheiro et al, 2009) e esse fator possui alta similaridade com G/HBF-1 responsivo à estresse bióticos (Dröge-Laser, et al, 1997) e com GmbZIP105 responsivo à *P. pachyrhizi* (Alves, et al, 2015).

A inoculação de esporos de *P. pachyrhizi* em *Arabidopsis thaliana* mostra a ativação de genes responsivos aos hormônios jasmonato e etileno, semelhante a resposta à infecção de um patógeno necrotrófico. Com o tratamento, não é observada a ativação de genes responsivos a ácido salicílico, o que era esperado visto que *P. pachyrhizi* é um patógeno biotrófico (Campe et al, 2014).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a dinâmica de sinalização hormonal durante a infecção por *P. pachytrichi* em soja, tendo em vista a hipótese de que o fungo possa induzir uma resposta mediada por JA nos iniciais de seu desenvolvimento, favorecendo o processo de infecção. Além disso, o presente trabalho propõe investigar o papel funcional de GmbZIP89 em soja durante o ataque de *P. pachytrichi*, uma vez que, além da similaridade existente entre este fator de transcrição e outros transcritos responsivos ao ataque do fungo, estudos prévios mostram que este gene é induzido por JA. Com isso, esse trabalho também objetiva investigar o papel do fator de transcrição GmbZIP89 em vias de defesa de soja sob a infecção com *P. pachytrichi*.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – *Phakopsora pachyrhizi* e a ferrugem asiática:

Phakopsora pachyrhizi é um fungo patogênico de plantas obrigatório, biotrófico, que causa a doença, em soja, comumente conhecida como ferrugem asiática. *P. pachyrhizi* primariamente coloniza o tecido foliar, causando danos e abscisão prematura das folhas. A infecção pode resultar em perdas com relação à massa fresca de 10% durante a fase inicial da doença até 80% durante epidemia severa (Miles et al, 2011; Patil et al, 1997). A infecção com *P. pachyrhizi* é uma das principais limitações da cultura da soja na América do Sul (Goelner et al, 2010) e no Brasil já levou à perdas de mais de US\$ 10 bilhões desde a detecção do patógeno no país (Silva et al, 2014; Langenbach et al, 2016).

A infecção de *P. pachyrhizi* na folha do hospedeiro ne inicia pela epiderme de folhas intactas. Da germinação dos esporos denominados uredósporos, forma-se o tubo germinativo, que termina na formação de uma estrutura globosa denominada apressório (Goellner et al, 2010). A penetração do apressório ocorre pela cutícula da célula hospedeira através de força mecânica e liberação de enzimas (Edwards e Bonde, 2011) (Figura 1A). Do apressório inicia-se a formação da hifa de penetração no espaço intercelular que se expande ate alcançar a outra extremidade da célula hospedeira, podendo formar hifas secundárias (Edwards e Bonde, 2011; Oliveira, 2014) (Figura 1B). Por fim, ao atingir as células do mesófilo, a hifa diferencia-se em célula mãe do haustório e dá origem ao haustório, iniciando a fase biotrófica do fungo (Figura 1C).

O haustório é uma hifa altamente especializada responsável pela absorção de nutrientes, além disso é a principal estrutura que atua na síntese e secreção de moléculas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira (Yoshida et. al, 2016). Segundo Hogenhout et. al (2009), efetores são moléculas secretadas por organismos que se associam às plantas e modificam a estrutura e a função da célula hospedeira. Os efetores secretados por fungos causadores de ferrugens induzem uma série de alterações bioquímicas e estruturais que levam à modulação de mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo determinantes para o sucesso do processo de infecção (Catanzariti et. al, 2007; Stergiopoulos et. al, 2009).

Dentre as principais estratégias disponíveis para o manejo e controle da ferrugem asiática destaca-se a utilização de fungicidas químicos, que apresentam altos

custos. O uso contínuo de fungicidas exerce uma pressão seletiva que favorece o aparecimento de raças resistentes (Godoy et al, 2015; Langenbach et al, 2016) e comprometem a qualidade do solo e água. Dessa forma, outras estratégias de controle podem ser vantajosas para o manejo da doença, sendo que uma excelente estratégia é o uso de genótipos de soja resistentes a infecção por *P. pachyrhizi* (Langenbach et al, 2016).

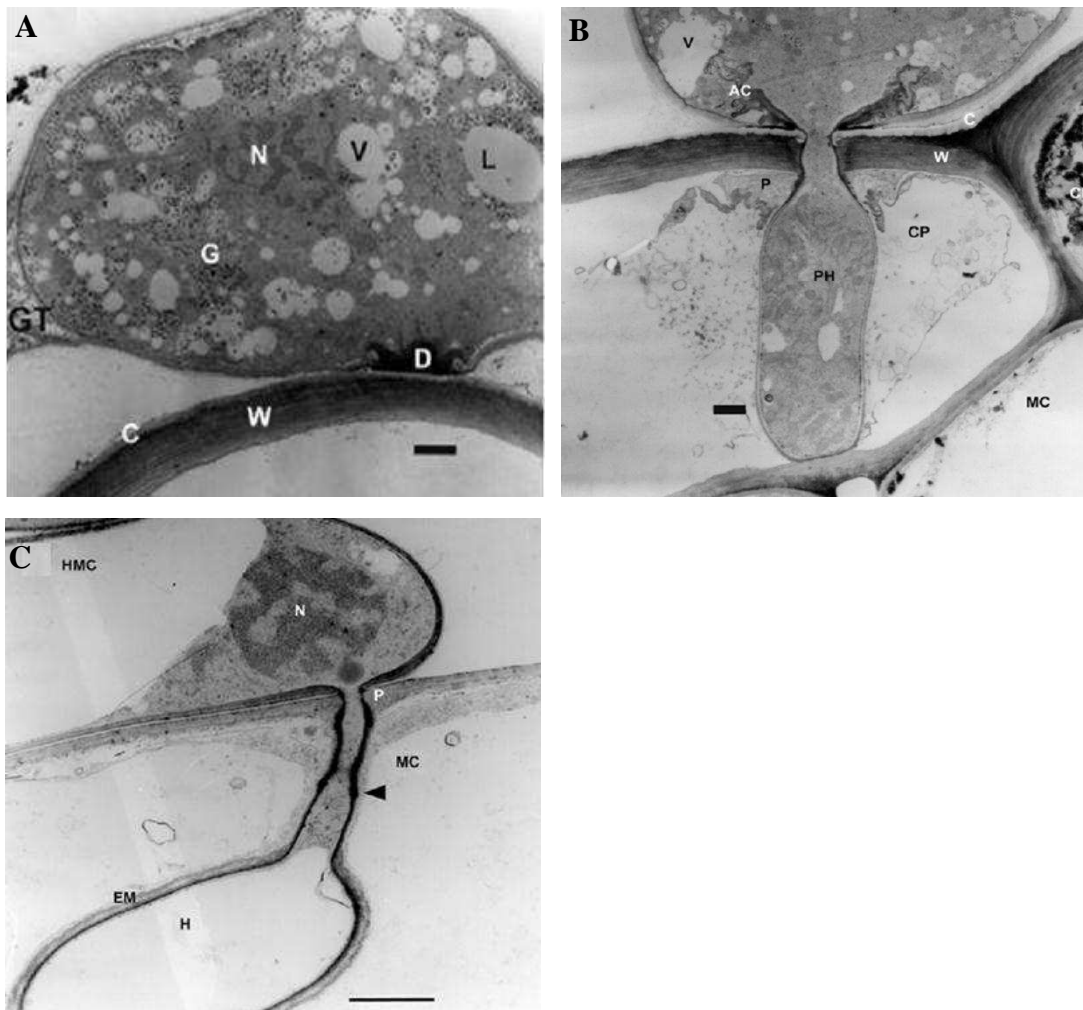


Figura 1: Estruturas de infecção de *P. pachyrhizi* (Edwards e Bone, 2011). Apressório (A); Hifa de penetração (B); Formação do haustório à partir da célula mãe (C). AC: cone apressorial; C: cutícula do hospedeiro; CP: citoplasma; D: local que iniciará a penetração; EM: membrana extra-haustorial; G: grânulos; GT: turbo germinativo; H: haustório; HMC: célula mãe do haustório; L: Lipídeo; MC: célula do mesófilo; N: núcleo; PH: hifa de penetração; V: Vacúolo.

Foram encontrados seis locos em soja (*Glycine max*) que conferem ou imunidade, Rpp1, ou resistência com pouca ou nenhuma esporulação, Rpp1b, Rpp2, Rpp3, Rpp4, Rpp5e Rpp6 (Monteros et al, 2007; Garcia et al, 2008; Goellner et al, 2010; Miles et al, 2011; Li et al, 2012). No entanto, a resistência mediada por esses genes R, herdada de forma dominante, tem sido sobreposta na natureza devido a grande capacidade do fungo de desenvolver novas raças, sendo que nenhum dos cultivares disponíveis é resistente à todos os isolados de *P. pachyrhizi* (Goellner et al, 2010; Miles et al, 2011). Embora hajam esforços na tentativa de identificar e caracterizar as proteínas secretadas pelo haustório do fungo, até o momento ainda não foi isolada nenhuma molécula efetora de *P. pachyrhizi* reconhecida por alguma proteína codificada pelos genes Rpp.

O potencial destrutivo de *P. pachyrhizi* juntamente com sua recente introdução nos principais países produtores de soja do hemisfério ocidental gerou interesse no entendimento das interações moleculares envolvendo o fungo, a soja e plantas não hospedeiras (Hoefle et al, 2009; Goellner et al, 2010). Dessa forma, a identificação e caracterização de genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção pelo fungo são essenciais para o desenvolvimento de plantas com resistência durável e de amplo espectro contra a ferrugem asiática (Goellner et al, 2010).

2.2 – Sistemas de defesa em plantas:

Interações entre plantas e patógenos geralmente se enquadram nas categorias de compatíveis ou incompatíveis. Em interações compatíveis, a planta hospedeira suporta o desenvolvimento e a colonização do patógeno, frequentemente resultando em doença. Em interações incompatíveis, a planta é resistente ao crescimento de um patógeno, resultando em nenhuma doença ou em doença reduzida (Stael et al, 2015).

Respostas de defesa da planta são acionadas ou por reconhecimento inespecífico ou específico de patógenos potenciais (Bent and Mackey, 2007; Wan et al, 2008). Um tipo de defesa, mediada pelo reconhecimento inespecífico, é chamado de imunidade molecular associada a patógeno (PTI) e é acionada por propriedades conservadas de uma determinada classe de patógenos (Mackey e McFall, 2006; Jones e Dangl, 2006; Bent e Mackey, 2007; Schineider et al, 2011). Por exemplo, células vegetais reconhecem certas bactérias através da percepção de fragmentos da proteína flagelina altamente conservada (Meindl et al, 2000), enquanto muitos fungos são reconhecidos

através de fragmentos da parede celular derivados de polímeros de quitina (Wan et al, 2008). Patógenos bem sucedidos são capazes de superar a PTI através da ação de proteínas efetoras que suprimem ativamente a defesa do hospedeiro (Jones e Dangl, 2006; Mackey e McFall, 2006; Bent e Mackey, 2007; Schineider et al, 2011). Por outro lado, plantas desenvolveram genes de resistência (R) que medeiam o reconhecimento específico de efetores produzidos pelos patógenos, causando respostas de defesa maciças (Jones e Dangl, 2006; Mackey e McFall, 2006; Bent e Mackey, 2007). Esta imunidade direcionada a proteínas efetoras (ETI) freqüentemente resulta em uma resposta hipersensível que diminui a invasão do patógeno.

Como outros patógenos, ferrugens podem escapar ou evitar PTI através de distintas fases de seus ciclos de vida, elicitando ETI através de secreção de efetores (Ravensdale et al, 2011). Alguns genes R medeiam respostas rápidas e antecipadas que impedem o crescimento sem sintomas macroscópicos. Outros genes R permitem o crescimento por um curto período de tempo até o reconhecimento do patógeno, no momento em que a resposta hipersensível macroscópica ocorre (Ravensdale et al, 2011).

De acordo com o modo de nutrição, os patógenos são divididos em três grandes classes: biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos. Patógenos biotróficos, tais como fungos de ferrugem, mantêm a fisiologia e a viabilidade da célula hospedeira das quais obtém seus nutrientes, uma vez que requerem tecidos vivos para completar seus ciclos de vida (Ravensdale et al, 2011; Mengiste, 2012). Patógenos necrotróficos obtém seus nutrientes de células mortas previamente ou durante a colonização. Geralmente, produzem muitas substâncias tóxicas e enzimas de degradação de parede celular para induzir necrose e a liberação de nutrientes. Patógenos hemibiotróficos primeiramente apresentam uma fase biotrófica e em determinado ponto do seu ciclo de vida passam a exibir um estilo necrotrófico de nutrição (Mengiste, 2012).

Fitohormônios constituem uma importante classe de moléculas sinalizadoras que atuam downstream à ativação da PTI e ETI como reguladores centrais da rede de sinalização imune da planta. Ácido Salicílico (SA), Jasmonato (JA) e Etileno (ET) são os principais hormônios mediadores da defesa da planta à patógenos (Bigeard et al, 2015). Classicamente, ocorre um aumento na síntese de SA e indução da via mediada por esse hormônio quando a planta é infectada por patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que sob ataque de patógenos necrotróficos e herbívoros, é induzida a síntese e a resposta mediada por JA e ET (Pieterse et al, 2012). Geralmente,

essas duas vias de resposta são antagônicas, ou seja, a indução de uma elevada resistência à patógenos biotróficos está relacionada ao aumento da suscetibilidade à patógenos necrotróficos, e vice-versa (Pieterse et al, 2012).

Quando a síntese de SA é induzida, ocorre uma mudança no estado redox no citoplasma da célula, o que leva a monomerização das proteínas NPR1 pela atividade de tiorredoxinas. Nessa forma, NPR1 é translocado para o núcleo onde atuará, juntamente a fatores de transcrição TGAs, como coativador transcricional de genes de defesa, dentre eles alguns genes PR (Pathogenesis-Related) os quais apresentam atividade antimicrobiana (Pieterse, et al, 2012; Bigeard et al, 2015). Uma consequência característica desta via é a indução da Resposta Hipersensível (HR) que induz a produção de espécies reativas de oxigênio e leva a morte celular programada no local da infecção, impedindo a disseminação do patógeno (Vlot et al, 2009; Yan e Dong, 2014). Estudos mostram que sob indução da sinalização via SA, NPR1, TGAs e fatores de transcrição WRKY são capazes de suprimir a sinalização via JA (Pieterse et al, 2012).

Após a síntese de JA na célula, este é metabolizado à metil jasmonato ou conjugado à aminoácidos, como isoleucina (JA-Ile). A proteína COI1 (Coronatine insensitive 1) juntamente com o repressor transcricional JAZ (Jasmonate ZIM) atuam como reguladores chave da resposta à JA, funcionando como receptor de JA no complexo SCF^{COI1}. A ligação de JA-Ile à COI1 leva à ubiquitinação e subsequente degradação da proteína repressora JAZ pelo proteassomo. Essa proteína reprime a sinalização mediada por JA por ligação à reguladores transcricionais positivos da via, como MYC2, MYC3 e MYC4. Quando degradada pelo proteassomo, estes fatores ativam a transcrição de importantes genes de defesa, como VSP2 (Vegetative Storage Protein2), que codifica uma proteína com atividade ácido fosfatase e PDF1.2 (Plant Defensin1.2), que codifica uma defensina com atividade anti fúngica (Pieterse, et al, 2012). Além de JA, a indução de PDF1.2 é dependente da via de sinalização mediada por Etileno (ET). Em células que recebem estímulo de JA e ET ocorre a ativação de ERF1 e possivelmente ORA59, ativadores transcricionais de PDF1.2 (Pieterse et al, 2012).

2.3 - Fatores de transcrição bZIP e GmbZIP89:

Uma resposta de defesa efetiva contra patógenos é dependente de uma grande reprogramação gênica, consequência do reconhecimento de moléculas e efetores do

organismo invasor (Sree et al, 2015). Nesse contexto, destaca-se a atividade dos fatores de transcrição. Fatores de transcrição são proteínas regulatórias que interagem com a maquinaria geral de transcrição e modulam a expressão de um grupo específico de genes através de ligação sequência-específica com o DNA e interações proteína-proteína. (Franco-Zorrilla et al, 2014). Eles atuam como ativadores ou repressores da expressão gênica dependendo do estímulo recebido, sendo cruciais para a resposta de defesa adaptativa (Latchman, 2010).

Vários fatores de transcrição de famílias distintas estão ligados à resposta da planta ao ataque de patógenos e entre estes está a numerosa família bZIP (Basic Leucine Zipper) (Dröge-Laser et. al, 1997; Zhang et. al, 2009; Zhang et. al, 2014; Wang et. al, 2015; Alves, et. al, 2015; Lim, et. al, 2015). O motivo bZIP se caracteriza por possuir um domínio de ligação ao DNA formado por duas estruturas em forma de alfa hélice: a primeira é constituída de uma região básica de aproximadamente 16 resíduos de aminoácidos contendo um sinal de localização nuclear seguida de um motivo N-x7-R/K; a segunda região é formada por alguns resíduos de leucina espaçados regularmente em intervalos de seis aminoácidos, posicionados exatamente 9 aminoácidos antes do C-terminal, criando uma hélice anfipática. Em alguns representantes desta família as leucinas às vezes são substituídas por isoleucinas, valinas, fenilalaninas ou metioninas. (Jakoby et. al, 2002). Para se ligar ao DNA, duas subunidades se ligam via interações hidrofóbicas de suas hélices formando homo ou hetero-dímeros dando origem ao zíper de leucina. (Schütze et al., 2008).

O genoma da soja apresenta 176 prováveis genes que codificam fatores de transcrição bZIP (Wang et al, 2010). Destes, foi avaliada a expressão de 131 genes em resposta a desidratação, ao frio, ao NaCl e ao hormônio ABA em soja. Os autores relataram que 49 genes foram responsivos a pelo menos 1 dos 4 tratamentos realizados (Liao et al, 2008). Recentemente, estudos relacionando estresses bióticos e os fatores de transcrição bZIP vem mostrando o grande envolvimento desta família na defesa contra patógenos (Zhang et al, 2009; Zhang et al, 2014; Lim et al, 2015; Wang et al, 2015). Alves et al, (2015) promoveram a identificação e caracterização de quatro genes de soja da família bZIP (GmbZIP62, GmbZIP105, GmbZIPE1 e GmbZIPE2) e os quatro foram responsivos ao ataque do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador de uma das mais importantes doenças da soja.

As sequências de fatores de transcrição são conservadas entre as espécies e um fator conservado que responde a um determinado estímulo em uma espécie, por

exemplo resposta a estresse, pode responder ao mesmo estímulo nas outras espécies (Pinheiro et al., 2009). Visando identificar fatores de transcrição cruciais para respostas de defesa da planta contra a infecção por ferrugem asiática, Soares (2010) documentou a existência de genes diferencialmente expressos durante a infecção por meio da análise de uma biblioteca subtrativa. Essa biblioteca foi construída utilizando plantas de soja suscetíveis e resistentes infectadas pelo fungo *P. pachyrhizi*. Dentre os genes diferencialmente expressos encontrados está o fator de transcrição da família bZIP, GmbZIP89. Esse fator apresenta 69% de similaridade de sequência com G/HBF-1 responsivo à estresse bióticos (Dröge-Laser et. al, 1997) e 87% com GmbZIP105 responsivo à *P. pachyrhizi* (Alves et. al, 2015) (dados não publicados).

Quando expressa em células de *S. cerevisiae* linhagem AH109, a fusão translacional da proteína bZIP89 ao domínio de ligação ao DNA de GAL4 apresenta propriedades de ativação transcricional. Isso mostra a capacidade da proteína GmbZIP89 de agir como fator de transcrição, sendo capaz de recrutar a maquinaria de transcrição da célula (dados não publicados).

Os fatores de transcrição bZIP em plantas, são importantes reguladores de genes de resposta à estresses abióticos, maturação de sementes, desenvolvimento floral e defesa contra patógenos (Alves et al, 2014). A análise da expressão tecidual de GmbZIP89 mostra um resultado de expressão predominantemente maior na raiz e em folhas, que são altamente expostos à estresses (dados não publicados).

A manipulação genética é uma ferramenta promissora para possibilitar o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com expressão acentuada de resistência à determinada doença. Dessa forma, estudos focados em proteínas que fazem parte da resposta de defesa de soja sob infecção de *P. pachyrhizi* podem fornecer alvos potenciais para se obter genótipos resistentes à ferrugem.

3 – OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a sinalização hormonal e o papel do fator de transcrição GmbZIP89 em vias de defesa de soja durante a infecção por *Phakopsora pachyrhizi*.

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 – Avaliar a expressão de GmbZIP89 e de genes marcadores das vias mediadas por Ácido Salicílico e Jasmonato em plantas tratadas com ácido salicílico e metil jasmonato;

3.1.2 – Avaliar a expressão de GmbZIP89 e de envolvidos nas vias de sinalização mediadas por ácido salicílico e jasmonato em plantas resistentes e suscetíveis infectadas com *Phakopsora pachyrhizi*.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Avaliação da concentração ideal de amplificação e teste de eficiência dos oligonucleotídeos:

As sequências codificadoras utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram obtidas no banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). O programa Primer Express versão 3.0 (Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os oligonucleotídeos à partir das sequências obtidas. Foi feita uma reação de PCR utilizando-se um cDNA previamente obtido de plantas de soja saudáveis para verificar a amplificação específica dos genes de interesse. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose (2%). Assim, no presente trabalho foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na tabela 1.

Para se alcançar maior eficiência da reação, foram determinadas as concentrações ideais de amplificação de cada conjunto de oligonucleotídeos, além disso a eficiência da amplificação foi calculada. Para determinação da concentração ideal de cada primer, como molde para reação utilizou-se 100 ng de cDNA de soja sadia previamente obtido. Foram testadas as seguintes concentrações dos oligonucleotídeos: 0,5 μ M, 1 μ M, 1,5 μ M, 2 μ M e 2,5 μ M. Todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação (melting) a fim de detectar se há amplificação inespecífica.

Utilizou-se a concentração à partir da qual obteve-se a maior amplificação para realizar uma curva padrão, a fim de verificar a eficiência de amplificação da reação. O coeficiente angular da regressão linear obtida (slope) foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação da reação, conforme equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$. Desta forma, para obter a curva de eficiência de amplificação da reação de qPCR foram realizadas reações utilizando-se cDNA de plantas de soja sadia previamente obtido em 5 diluições seriadas de 1:10 partindo de 100 ng.

Gene		Nome	Proteína	Sequência
20g36750	Alvo	Fw: bZIP89 Rv: bZIP89	Fator de transcrição da família bZIP	CCAAACTTCTCCAGATGA GGAAGAAGACGGAGGAGAG
18g03151	Alvo	Fw: PDF1.2 Rv: PDF1.2	Plant defensin 1.2	TTATGTGCTAAGCGCAGCAAGA TCCTTAGTCCTGCATTGCTTGTCT
0701740	Alvo	Fw: VSP2 Rv: VSP2	Vacuole storage protein 2	CATGGCCACAGCTACCAAATT TTGCACGATACCTCCGGAAT
13g17180	Alvo	Fw: JAZ1 Rv: JAZ1	Jasmonate-zim-domain protein 1	CAAACGGTTCCTGAGACA TGGGTCCCGTTGCGTGAT
11g34940	Alvo	Fw: COI1 Rv: COI1	Coronatine Insensitive 1	CTCAGTACTTCGATTGCTCAAGAG ACGAGCGAGATTCCGAAGATC
07g057900	Alvo	Fw: JAR1 Rv: JAR1	Jasmonate Resistant 1	TACCGACTTGGTGATGTGGTTAAG AGATTGCTACGCCGAACGAA
15g02590	Alvo	Fw: JR1 Rv: JR1	Jasmonate Responsive 1	AGGCACCCCGTCATTCT GAGTCCCTTCTCAACTCCATAGG
09g204500	Alvo	Fw: MYC2 Rv: MYC2	Fator de transcrição bHLH	TCTTCCTCGTGTGATGACTCA GACCGGGCTCGAGTTAAAAAA
11g13880	Alvo	Fw: LOX2 Rv: LOX2	Lipoxigense 2	TGCAATGCACCCAATCTACAG GGGCCTCGCGAGCAA
05g30490	Alvo	Fw: LSD1 Rv: LSD1	Lesion simulating disease 1	TGTTCACCAGCATCTAATCAAGT GGAGCTCCATAAGGATACATGAGTGT
13g18410	Alvo	Fw: ORA59 Rv: ORA59	Fator de transcrição AP2/ERF	GCAGCACTGGCTTATGACCAA CTCACCACTTCTTCTGGGAAATTC
15g06780	Alvo	Fw: PR1 Rv: PR1	Não conhecida (atividade anti-fúngica)	AACTATGCTCCCCGCAACTATATTG TCTGAAGTGGCTTTACATCGAAACAA
03g132700	Alvo	Fw: PR2 Rv: PR2	B,1-3 glucanase	TTCCGGTTGATGCTGTTTATGCT GCCATCCACTCTCAGACACAACCT
16g119200	Alvo	Fw: PR3 Rv: PR3	Quitinase	CCGGATACGGTGTGATCAC CGACTTTGGACCCGAGAATC
19g245400	Alvo	Fw: PR4 Rv: PR4	Quitinase	TGCGGGTGACAAATACAGGAA TGCTGCACTGATCTACGATTCTC
14g077300	Alvo	Fw: PR5 Rv: PR5	Thaumatococcus-like protein	CCGACGCGTTATTCAAGAT CAAATGCTTGAAGGGTCAATCGT
09g064700	Alvo	Fw: NPR1 Rv: NPR1	Nonexpresser of pr genes 1	AGCGGCTTCTCAAGCATGT ACGTTGTAGTCTTGGCCACTT
20g246400	Alvo	Fw: TGA2 Rv: TGA2	Fator de transcrição da família bZIP	GCTAGGCAGCATGGGATTTTC TCAAATTGCATTGCCCCATT
12g170000	Endógeno	Fw: Helicase Rv: Helicase	Helicase	TAACCCTAGCCCCTTCGCCCT GCCTTGTCTGCTTCTCTCTCG
12g05510	Endógeno	Fw: FBox Rv: FBox	F-box protein family	AGATAGGGAAATTGTGCAGGT CTAATGGCAATTGCAGCTCTC
06g04180.1	Endógeno	Fw: UKN2 Rv: UKN2	Hypothetical protein	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG ACCTCTCTCAAACCTCTCTG
20g27950.1	Endógeno	Fw: UBI3 Rv: UBI3	Ubiquitin ribossomal protein 3	GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG
05g24110.1	Endógeno	Fw: ELF1A Rv: ELF1A	Translation elongation factor 1-alpha	GACCTTCTCGTTTCTCGCA CGAACCTCTCAATCACACGC

Tabela1: Oligonucleotídeos específicos para qPCR.

4.2 – Tratamento com fitohormônios.

Para avaliar o perfil de expressão de GmbZIP89 em resposta à aplicação exógena dos fitohormônios Metil Jasmonato (MeJA) e Ácido Salicílico (SA), sementes de soja da linhagem CD206 foram inicialmente germinadas em papel filtro umedecido. O papel foi umedecido uma vez ao dia e após quatro dias de germinação as sementes foram transferidas para substrato. Ao atingir o estágio V2, as plantas foram transplantadas para terra com adubo orgânico e no estágio V3 foram tratadas com MeJA 100 μ M e SA 3 mM. O primeiro trifólio, já totalmente desenvolvido das plantas, foi coletado em triplicada nos tempos 0h, 30 min, 1, 2, 6, 12 e 24 horas após o tratamento. O material vegetal após a coleta foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e em seguida armazenado em -80 °C até a extração de RNA.

4.3 – Infecção com *Phakopsora pachychizi*

Para avaliar a expressão do gene GmbZIP89 e de genes marcadores das vias de sinalização mediadas por SA e JA, durante a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*, plantas resistentes (PI561356) e suscetíveis (EMBRAPA48) foram infectadas com o fungo. Amostras de soja foram plantadas e mantidas em casa de vegetação, sob condições de temperatura (22 \pm 1°C) e umidade (>60%) controladas, e fotoperíodo de 12h, até o estágio de desenvolvimento V3 (30 dias). O experimento seguiu-se em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições (cada repetição contendo três replicatas), e estrutura de tratamentos em fatorial com dois fatores: tempo de coleta (12, 24, 48, e 192 horas após inoculação) e genótipos (PI561356 e Embrapa 48). A infecção foi induzida através da pulverização de uma suspensão de esporos (3x10⁵ esporos/mL) em plantas nos estádios V2 para V3 de crescimento em triplicata. Como controle dos tratamentos, plantas nos mesmos estádios citados foram submetidas a um tratamento de falsa inoculação (MOCK) para cada respectivo tempo de infecção. Após 12, 24, 48 e 192 horas de inoculação, o material foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, armazenadas a -80 °C até o processamento para extração de RNA.

4.4 - Extração de RNA e síntese de cDNA para qPCR.

O RNA total de todas as amostras tratadas foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com três unidades de DNase livre de RNase (Invitrogen). Após a extração e purificação, a qualidade do RNA foi analisada em gel de agarose 1,5% (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1µg/mL. Em seguida, o RNA foi quantificado em NanoDrop 2000C (Thermo Fisher). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Promega), segundo especificações do fabricante. O cDNA sintetizado foi então quantificado também em NanoDrop 2000C (Thermo Fisher).

4.5 - PCR em Tempo Real (qRT-PCR) e análises estatísticas.

O procedimento de PCR em Tempo Real foi realizado seguindo os manuais da Applied Biosystems. As reações foram conduzidas no aparelho Step One Plus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), sendo utilizados os oligonucleotídeos específicos descritos na Tabela 1, cDNAs dos tratamentos realizados e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o software Relative Expression Software Tool - REST 2009 (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>; Pfaffl, 2001; Pfaffl et al, 2002). Como controle endógeno para normalização dos dados do qPCR, foram utilizados a expressão dos genes Helicase e Fbox, que apresentaram menor variação entre os tratamentos, selecionados pelo programa GeNORM (<https://genorm.cmgg.be/>).

5 – RESULTADOS

5.1 – Análise da eficiência e concentração ideal dos oligonucleotídeos utilizados:

O método qPCR requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência, por isso foi feita a análise da eficiência e a concentração ideal de amplificação dos oligonucleotídeos a serem utilizados. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 2.

Gene	Eficiência	Concentração (μM)
bZIP89	1	0,5
PDF1.2	1	1,5
VSP2	0,683	2,5
JAZ1	0,871	1,5
COI1	1	2,0
JAR1	1	1,5
JR1	1	2,0
MYC2	1	2,0
LOX2	1	0,5
LSD1	0,892	1,5
ORA59	0,827	2,5
PR1	1	1,5
PR2	1	1,5
PR3	1	2,0
PR4	1	2,0
PR5	1	2,5
NPR1	1	2,5
TGA2	1	2,5
Helicase	1	1,5
Fbox	1	1,5
UKN2	1	2,5
UBI3	0,937	2,0
ELF1A	1	2,0

Tabela 2: Eficiência e concentração de uso dos oligonucleotídeos na qPCR.

5.2 - Avaliação da expressão do gene GmbZIP89 e de genes marcadores em resposta à aplicação exógena de fitohormônios:

O perfil transcricional do gene GmbZIP89 foi avaliado em relação ao tratamento com SA e MeJa, hormônios associados à ativação de respostas de defesa contra patógenos em plantas. Em relação ao tratamento com SA (Figura 2), um importante fitohormônio envolvido na regulação da defesa principalmente contra patógenos biotróficos, não foi observada a indução do gene GmbZIP89. Isso mostra que o hormônio não induz a expressão de GmbZIP89. A superexpressão de PR1, um gene marcador da via de SA, durante o tratamento mostra que foi ativada a via de sinalização mediada por SA. Além disso o gene VSP2, marcador da via dependente de JA, foi reprimido 1 h e 12 h de tratamento. Quanto ao tratamento com MeJA forma análoga e ativa de JA, que participa na regulação da defesa sob o ataque de patógenos necrotróficos e herbívoros, o gene GmbZIP89 foi fortemente induzido entre 6 e 12 horas de tratamento, apresentando um pico de expressão em 6h. Isso evidencia que JA induz fortemente expressão de GmbZIP89. A superexpressão de VSP2 mostra que houve a ativação da via de sinalização mediada por JA e não houve indução do gene PR1.

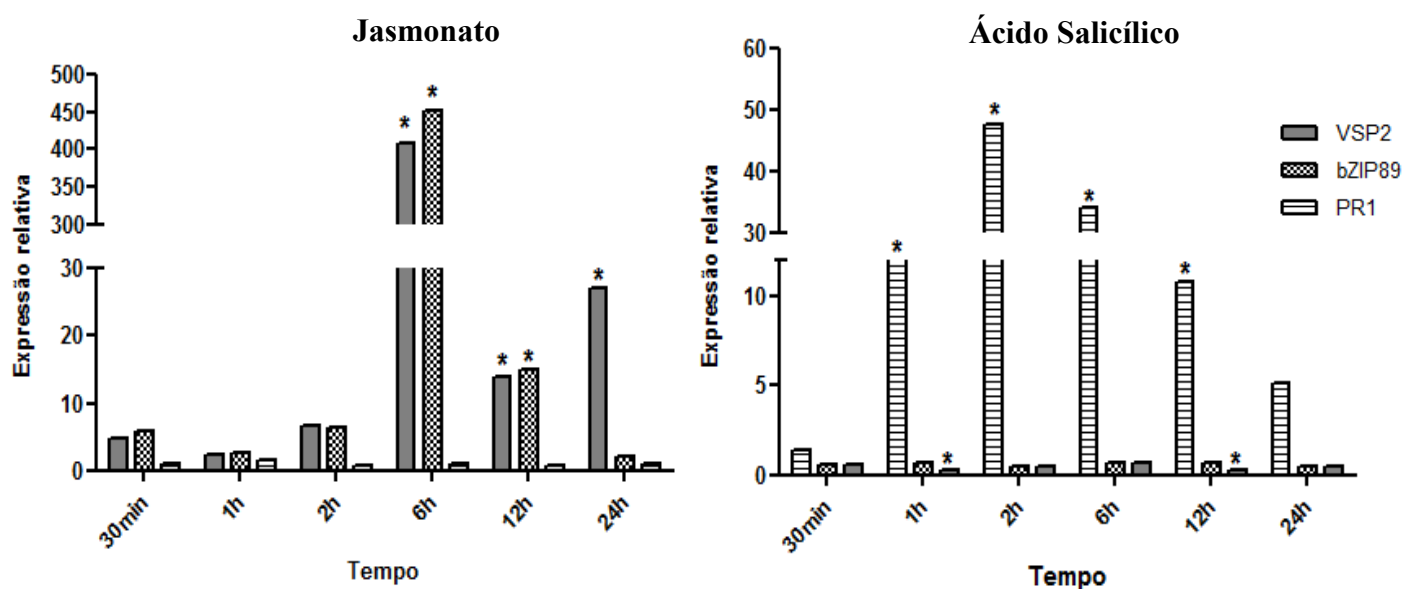


Figura 2: Expressão do gene GmbZIP89, PR1 e VSP2 em resposta ao tratamento com JA e SA. O experimento foi conduzido em triplicatas e as médias indicadas com asterisco diferem significativamente do tratamento controle. A expressão dos genes ELF1A e UBI3 foram utilizados para normalização dos dados no tratamento com SA; e UKN2 e UBI3 no tratamento com JA.

5.3 – Análise da expressão de GmbZIP89 e de genes envolvidos na via mediada por SA e JA em resposta a infecção por *P. pachyrhizi*.

Foi avaliada a expressão do gene GmbZIP89 e de genes envolvidos na sinalização mediada por SA e JA durante a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* em plantas de soja resistentes (PI561356) e suscetíveis (EMBRAPA48) à infecção. Nas plantas resistentes (figura 3), quanto aos genes envolvidos na via mediada por JA temos que PDF1.2 não sofreu alteração no número de transcritos, mas vários genes foram reprimidos: GmbZIP89 (24 hai), VSP2 (48 hai), JAR1 e JR1 (24 hai), COI1 e ORA59 (12 e 24 hai). Em contrapartida, JAZ1 foi induzido 12 hai, havendo também indução dos genes envolvidos na sinalização via SA, PR1 (12 e 48 hai) e TGA2 (12, 48 e 192 hai). Nas plantas suscetíveis (figura 4), observa-se indução na expressão de quase todos os genes responsivos à JA no início e/ou no final do tratamento: bZIP89 e VSP2 (12 e 192 hai), PDF1.2 (12 hai), JAR1 (12hai) e JR1 (192 hai), COI1 (192 hai). ORA59 não teve alteração de expressão. Já o gene que codifica a proteína JAZ1 foi reprimido 12 e 24 hai. Quanto aos genes envolvidos na via de SA, não foi observada alteração no número de transcritos de TGA2 durante todo o tratamento e PR1 foi induzido 24 e 48 hai.

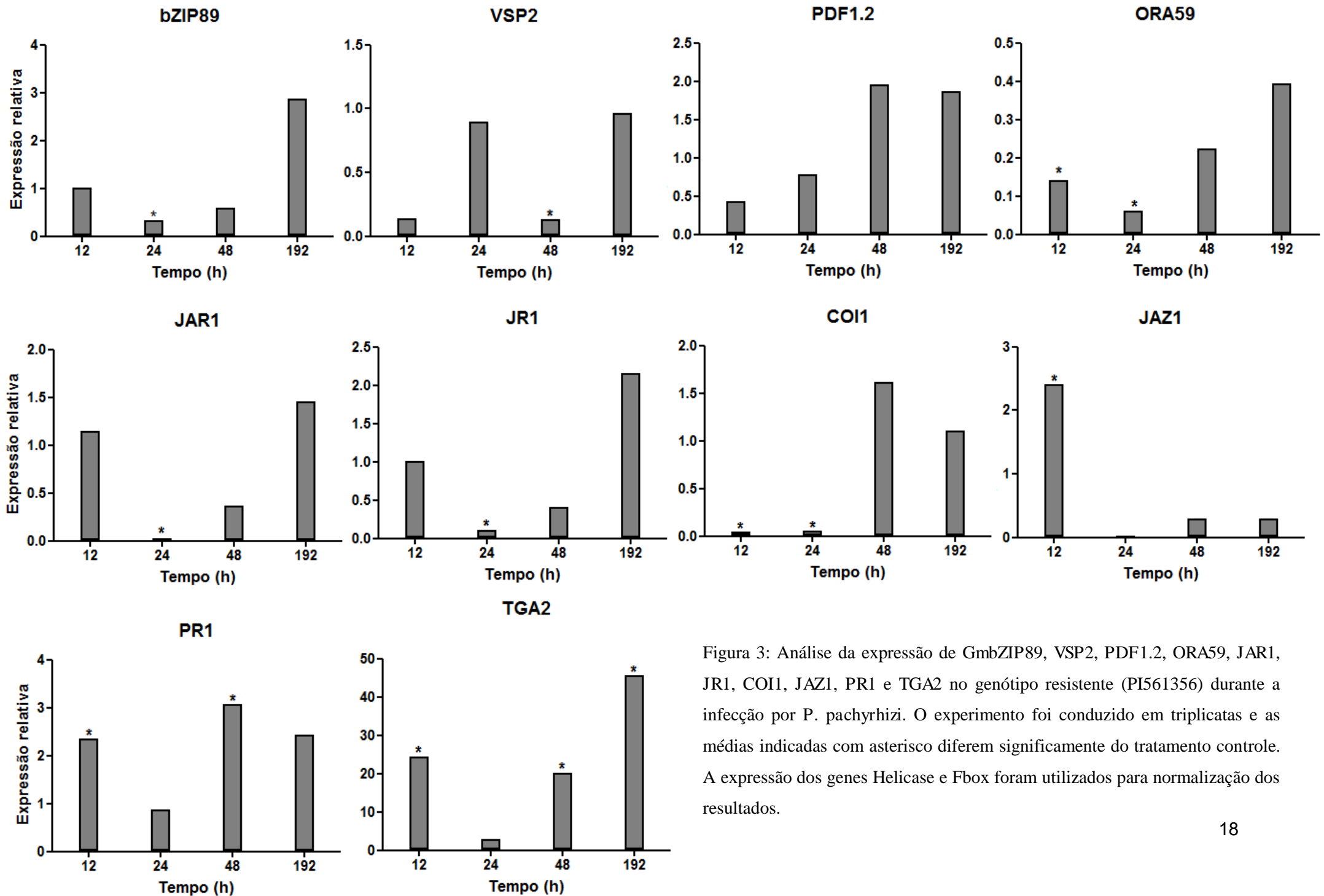


Figura 3: Análise da expressão de GmbZIP89, VSP2, PDF1.2, ORA59, JAR1, JR1, COI1, JAZ1, PR1 e TGA2 no genótipo resistente (PI561356) durante a infecção por *P. pachyrhizi*. O experimento foi conduzido em triplicatas e as médias indicadas com asterisco diferem significativamente do tratamento controle. A expressão dos genes Helicase e Fbox foram utilizados para normalização dos resultados.

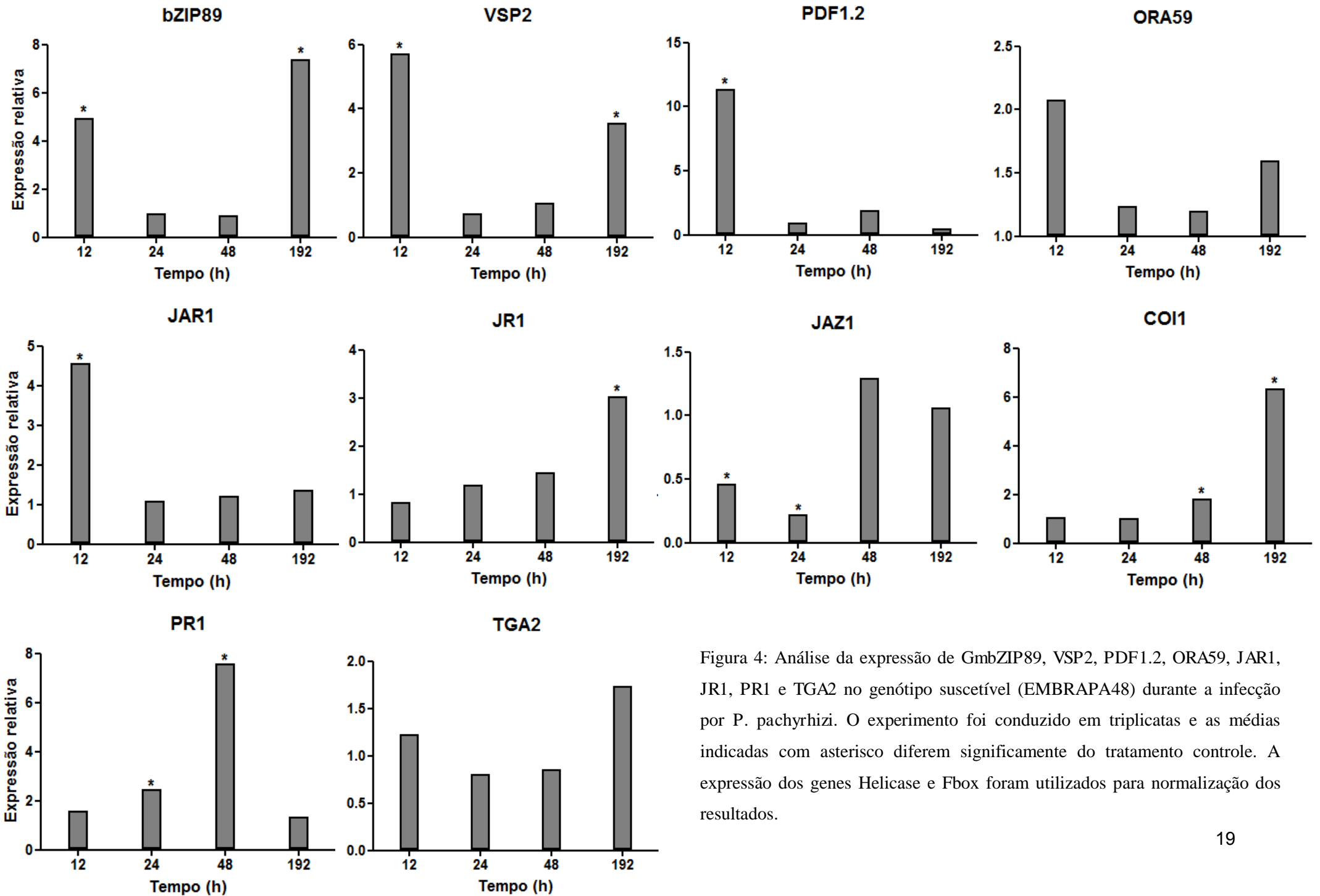


Figura 4: Análise da expressão de GmbZIP89, VSP2, PDF1.2, ORA59, JAR1, JR1, PR1 e TGA2 no genótipo suscetível (EMBRAPA48) durante a infecção por *P. pachyrhizi*. O experimento foi conduzido em triplicatas e as médias indicadas com asterisco diferem significamente do tratamento controle. A expressão dos genes Helicase e Fbox foram utilizados para normalização dos resultados.

Nas plantas resistentes infetadas com *P. pachyrhizi*, a indução de PR1 12 h e 48 h indica que ocorre a sinalização dependente de SA e a mesma prevalece em 192 h após a inoculação do patógeno. No genótipo suscetível ocorre a indução dos genes PDF1.2 e VSP2 nos momentos iniciais de infecção, indicando que ocorre a ativação da via dependente de JA e ET. Em tempos intermediários, observa-se a sinalização da via de SA indicada pela expressão de PR1. Já nos momentos tardios ocorre a ativação do gene VSP2, mostrando a ocorrência da sinalização dependente de JA (Figura 5).

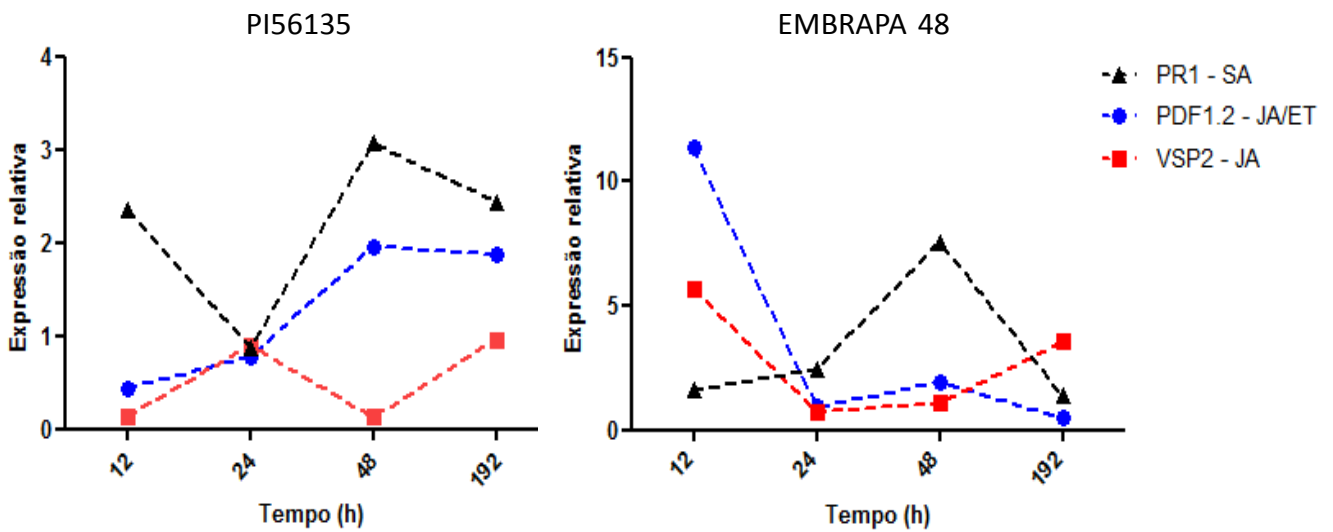


Figura 5. Sinalização hormonal ao longo da infecção de *P. pachyrhizi* nos genótipos suscetível (EMBRAPA48) e resistente (PI561356).

6 – DISCUSSÃO

Jasmonato (JA) e ácido salicílico (SA) são importantes hormônios mediadores de respostas de defesa de plantas contra patógenos (Robert-Seilaniantz et al, 2011). Classicamente, ocorre um aumento na concentração de ácido salicílico quando a planta é infectada por patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que sob ataque de patógenos necrotróficos e herbívoros ocorre a indução da síntese de jasmonato (Robert-Seilaniantz et al, 2011). Estas duas vias são muitas vezes antagônicas, ou seja, a indução de uma elevada resistência à patógenos biotróficos está relacionada ao aumento da suscetibilidade à patógenos necrotróficos, e vice-versa (Robert-Seilaniantz et al, 2011).

Em resposta à aplicação exógena de SA (Figura 2), os dados mostram que a expressão do gene GmbZIP89 não é induzida em resposta ao tratamento com hormônio, indicando que GmbZIP89 não é um gene responsivo à SA. A forte expressão de PR1, um gene marcador da via, mostra que a sinalização mediada por esse hormônio foi ativada. O gene VSP2, marcador da via dependente de JA, foi reprimido 1h e 12h após a aplicação de SA, mostrando que houve supressão da via de JA. Esse resultado mostra que sob a ativação da via de sinalização mediada por SA ocorre a inibição da via mediada por JA, confirmando o efeito antagônico da via de SA sobre JA. Quando se analisa o perfil de expressão de GmbZIP89 em resposta à aplicação de MeJA (Figura 2), observa-se forte expressão em 6h e 12 h após o tratamento com o hormônio, mostrando a responsividade de GmZIP89 à JA. A superexpressão de VSP2 6h, 12h e 24h de tratamento, indica a ativação mediada por esse hormônio. A expressão de PR1 se manteve baixa e não se observa a indução do gene ao longo de todo o tratamento, indicando que o efeito antagônico de JA sobre SA não culmina com a repressão de PR1, mas parece impedir sua indução.

Para avaliar a expressão do gene GmbZIP89, de genes responsivos à SA e JA e que codificam proteínas chave na regulação dessas vias de defesa durante a infecção por *P. pachyrhizi*, plantas resistentes (PI561356 – figura 3) e suscetíveis (EMBRAPA 48 – figura 4) foram infectadas com esporos do fungo causador da ferrugem asiática. Durante o tratamento, nas plantas resistentes não foi detectada alteração no número de transcritos de PDF1.2; VSP2 foi reprimido 48 h após a infecção. O gene JAR1, que codifica uma enzima responsável pela conjugação de JA à aminoácidos e JR1, que codifica uma enzima da via de biossíntese de JA, foram reprimidos 24h após a

inoculação do fungo. Em contrapartida, PR1 foi induzido 12h e 48h e TGA2, um fator de transcrição que participa da ativação transcricional de genes responsivos a SA, foi fortemente expresso 12h, 48h e 192h após a infecção. Esses resultados mostram que no genótipo resistente, ocorre a ativação da via de sinalização mediada por SA, que provavelmente inibe a ativação da resposta mediada por JA (figura 5).

TGA2 é um fator de transcrição da família bZIP que pode se ligar ao motivo TGACG em promotores responsivos a SA atuando como ativador transcricional (Pieterse et al, 2012). Triplos mutantes *tga256* em *Arabidopsis* falham tanto na expressão de genes responsivos a SA como na supressão da via de JA mediada por SA (Ndamukong et al, 2007). Estudos mostram que é provável que TGAs atuem no cross-talk JA/SA suprimindo a expressão de genes responsivos à JA (Spoel et al. 2003). No presente trabalho, as plantas resistentes exibiram uma forte expressão de TGA2 ao longo da infecção e foi observada a repressão de VSP2. Nas plantas suscetíveis, TGA2 não foi induzido e VSP2 foi superexpresso. Interessantemente, análise do promotor de VSP2 de soja apresenta o sítio de ligação de TGA2 (TGACG), isso sugere que TGA2 possa estar atuando diretamente na inibição da atividade do promotor de VSP2, mediando uma resposta antagonista de SA em relação à via de JA, uma hipótese que precisa ser testada experimentalmente.

ORA59 é um fator de transcrição da família AP2/ERF que atua na ativação dependente de ET e JA do gene PDF1.2 (Huang et al, 2015). Estudos em *Arabidopsis* mostram que SA pode afetar negativamente o acúmulo de ORA59 e conseqüentemente a indução de PDF1.2. Além disso, esse trabalho demonstra que promotores de genes responsivos à JA que são reprimidos por SA são enriquecidos de motivos GCC-box, aos quais se ligam ORA59, e que a presença desse motivo é suficiente para que haja a supressão (Van der Does et al, 2013). Nossos dados mostram que a expressão do gene ORA59 foi reprimida nas plantas resistentes, onde se detecta a ativação da via mediada por SA, além disso expressão de PDF1.2 não sofreu indução após a inoculação do fungo. Esses dados apontam uma possível consequência da ativação da via de SA e provê um mecanismo de supressão da via de JA por SA durante a infecção no genótipo resistente. Mazarei et al, (2012) demonstraram que duas unidades de GCC em tandem são suficientes para ligação *in vitro* de EREBP1, um fator de transcrição que se liga ao motivo GCC-box. A única região do promotor de PDF1.2 em soja que apresenta unidades GCC repetidas está à 786 pb do ATG da tradução. Essa região contém duas

unidades GCC espaçadas por uma A (GCCAGCC) e é uma candidata à ser o motivo GCC-box de ligação de ORA59. Mais estudos deverão ser feitos à fim de se detectar a funcionalidade dessa região como motivo de ligação de ORA59 e sua ligação com a supressão da via de JA por SA.

Schneider et al, (2011) demonstraram que durante a infecção do genótipo PI462312 de soja, que contém o gene de resistência Rpp3, com *P. pachyhzizi*, ocorre uma resposta de defesa bifásica. Nas primeiras 12 horas após a inoculação com o fungo ocorre uma explosão de expressão diferencial de genes, correlacionada com a formação e penetração do apressório nas células epidérmicas. Um período silencioso ocorre aproximadamente entre 24-48 horas após o tratamento, onde *P. pachyhzizi* continua a se desenvolver mas não elicitando resposta na planta. Aproximadamente 72 horas após a inoculação, ocorre uma segunda onda de intensa alteração na expressão gênica que é correlacionada com a formação do haustório. A proliferação do haustório coincide com a inibição do crescimento do fungo em interações incompatíveis e o início de um rápido crescimento da hifa de infecção em interações compatíveis.

No presente trabalho, demonstramos que nas plantas suscetíveis ocorre a indução de genes marcadores da via dependente de JA e Etileno (PDF1.2 em 12h), e responsivos apenas a JA (VSP2 12h e 192 h; JAR1 em 12h e JR1 em 192h de infecção). PR1 foi induzido nos momentos intermediários após o tratamento com o fungo, em 24h e 48h, onde não foi detectada indução de genes responsivos à JA. A indução dos genes responsivos a JA/ET nas plantas suscetíveis em 12 horas de infecção, mostra que nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, *P. pachyhzizi* induz a ativação da via de sinalização mediada por esses hormônios provavelmente em resposta à penetração das células epidérmicas pelo apressório do fungo. Em 24 horas, onde se detecta o maior desenvolvimento da hifa de infecção (Schneider et al, 2011), observa-se a indução de genes marcadores da via dependente de SA, o sinal de SA persiste em 48 horas de infecção e prevalece em 192 h (Figura 5). Isso sugere que elicitores biotróficos secretados pela hifa de infecção do fungo estão sendo, possivelmente, reconhecidos pelo sistema de defesa da planta (Alves et al, 2015). Em momentos mais tardios de infecção, em 192 horas, o marcador da sinalização de SA volta à seu estado basal de expressão e a via dependente de JA volta a ser ativada, indicado pela indução de VSP2. Isso sugere que efetores secretados pelo haustório do fungo operem de forma a induzir a via de resposta mediada por JA. Dessa forma, a resposta que *Phakopsora pachyhzizi* elicitando no

genótipo suscetível apresenta três fases distintas ao longo do o processo de infecção, a primeira induzida por JA/ET, a segunda por SA e a terceira por JA (Figura 5).

A infecção de *Arabidopsis thaliana* com o fungo causador da ferrugem asiática mostra a ativação de genes responsivos aos hormônios JA/ET, mas não de genes responsivos à SA. Esses resultados são também encontrados com o tratamento com um fluido de germinação originado de esporos do patógeno, indicando que a secreção de efetores do fungo leva a ativação da via de sinalização mediada por JA (Campe et al, 2014). A indução de resposta via JA/ET em estágios iniciais e por JA nos estágios tardios da infecção encontrada no presente trabalho apontam evidências claras de que em soja *P. pachyrhizi* mimetiza o ataque de um patógeno necrotrófico durante seu desenvolvimento ativando a sinalização JA e ET. Isso mostra um surpreendente resultado, pois de acordo com o próprio conceito que diferencia patógenos biotróficos de necrotróficos, a ativação de genes marcadores responsivos a SA seria esperada a partir da infecção por um patógeno biotrófico.

Entre *P. pachyrhizi* e a linhagem resistente PI561356 ocorre uma interação incompatível, pois esta apresenta o loco de resistência *Rpp1*. Essas plantas podem reconhecer moléculas elicitoras do patógeno e desencadear Resposta Hipersensível (HR), não permitindo a continuidade do ciclo de vida do fungo (EMBRAPA SOJA). O presente trabalho mostra a indução da via dependente de SA nas plantas resistentes. Uma característica da ativação da sinalização mediada por SA é a ocorrência de HR. HR induz a produção de espécies reativas de oxigênio que levam a lesões necróticas e morte celular no local da infecção, prejudicando a disseminação do patógeno (Vlot et al, 2009; Yan e Dong, 2014). Dessa forma, a ativação da sinalização via SA é crucial para resistência da planta.

A proteína COI1 juntamente com a JAZ são reguladores chave da via de sinalização mediada por JA. COI1 funciona como receptor de JA-Ile (jasmonato conjugado a isoleucina) na célula e a ligação de JA à COI1 leva a ubiquitinação e consequente degradação via proteassomo de JAZ, a proteína que na ausência de JA atua como repressor transcricional de genes de defesa mediada por ácido jasmônico (Nagels Durand et al, 2016). Em plantas resistentes, a expressão do gene que codifica a proteína JAZ1 foi induzida em 12 horas de tratamento e a expressão de COI1 foi reprimida em 12 e 24h de infecção com *P. pachyrhizi*. A indução de JAZ1 promove a inibição de genes responsivos a JA e a repressão de COI1 impede que a célula se sensibilize na presença

desse hormônio. Esse processo impede que seja ativada a sinalização via JA. Em contrapartida, nas plantas suscetíveis, a expressão de JAZ1 foi reprimida 12 e 24 após a inoculação do fungo e o gene COI1 foi fortemente induzido ao final do tratamento (192 horas). A repressão do gene que codifica a proteína JAZ1 leva a atividade transcricional de genes responsivos à JA, por exemplo de VSP2 e PDF1.2, já que provavelmente o acúmulo da proteína repressora está comprometido. Além disso, a indução de COI1 pode aumentar a sensibilidade da planta à JA, levando à maior degradação de JAZ1, favorecendo a expressão de genes de defesa que atuam em resposta a esse hormônio. Esses resultados demonstram que a regulação transcricional de JAZ1 e COI1 seja um possível e interessante mecanismo de modulação da defesa da planta por *P. pachyhzizi* durante a infecção. A repressão de JAZ1 e indução de COI1 durante a infecção pode ser consequência da atividade direta ou indireta de efetores do fungo e culmina na ativação da sinalização via JA que evita a defesa mediada por SA. Mecanismo semelhante decorrente da infecção de patógenos biotróficos em *Arabidopsis* já foi descrito por Gimenez-Ibanez et al, (2014). O trabalho demonstra que *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) 11528, apresenta um efector, HopX1, capaz de comprometer o acúmulo de JAZ, ativar a sinalização via JA e promover a infecção evitando HR.

Esse trabalho mostra que GmbZIP89 é induzido 12 e 192 horas após a infecção por *P. pachyhzizi* em plantas suscetíveis, mas reprimido em 24 horas de infecção em plantas resistentes. Além disso, temos que a via de sinalização mediada por JA culmina no aumento de transcritos de GmbZIP89. O aumento da expressão desse gene nestas condições sugere que GmbZIP89 pode estar atuando na ativação da expressão de genes responsivos à JA que inibem a defesa mediada por SA, ou mesmo como próprio repressor transcricional desta via.

Nas plantas resistentes infectadas com *P. pachyhzizi* não ocorre a indução da sinalização mediada por JA, importante para a infecção. Sem o aumento da concentração de JA o gene GmbZIP89 continua em estado de repressão e ocorre a indução da via de SA, dessa forma haverá HR impedindo a continuidade da infecção. Supomos que a liberação e ação de efetores do fungo tenham como consequência a modulação da expressão de GmbZIP89, JAZ1 e COI1 a ativação da via de JA e inibição da defesa via SA. Com a repressão da defesa dependente de SA, evita-se o processo de morte celular no local da infecção, consequência da HR. Isso garante uma vantagem adaptativa para o fungo pois aumenta a probabilidade de uma infecção bem sucedida,

uma vez que mantém a integridade do tecido foliar necessária para a infecção de um patógeno biotrófico.

6 – CONCLUSÃO

Durante processo de infecção de *P. pachyrhizi* na linhagem resistente, mostramos que não acontece a ativação de resposta mediada por JA, mas sim a indução da sinalização via SA que é crucial para a resistência da planta. No genótipo suscetível houve a indução da via de defesa mediada pelos hormônios JA e ET no estágio inicial de desenvolvimento do fungo, enquanto que em tempos intermediários, ocorre a ativação da resposta via SA. Já em tempos tardios de infecção, ocorre a ativação da sinalização via JA, importante para a patogenicidade do fungo.

TGA2 e ORA59 parecem estar envolvidos no crosstalk JA/SA durante a infecção. TGA2 é superexpresso em plantas resistentes e nessa condição supomos que atue na inibição transcricional de genes responsivos à JA, como VSP2. Há ainda a possibilidade de SA atuar na inibição de ORA59, o que compromete a indução de seus alvos, por exemplo PDF1.2.

A infecção de *P. pachyrhizi* elicitava no hospedeiro a ativação de vias de defesa responsivas à patógenos necrotroficos. Mostramos que a infecção culmina na regulação transcricional de JAZ1, que é reprimido, e COI1, que é induzido, o que leva a ativação da sinalização mediada por JA. Supomos que a infecção ainda leve a modulação da expressão de GmbZIP89 que, uma vez induzido, pode estar envolvido na ativação transcricional de genes importantes da sinalização via JA ou atuar como repressor transcricional da via de SA, em ambos os casos impedindo que a defesa dependente de SA seja induzida.

A ocorrência da sinalização ativada por JA e inibição da resposta via SA garante uma grande vantagem adaptativa para o fungo, pois impede a morte celular no local da infecção. A manutenção da integridade do tecido foliar é importante para patógenos biotróficos que necessitam de tecido vivo para obtenção de nutrientes e, dessa forma, possibilita a colonização e disseminação de *P. pachyrhizi*.

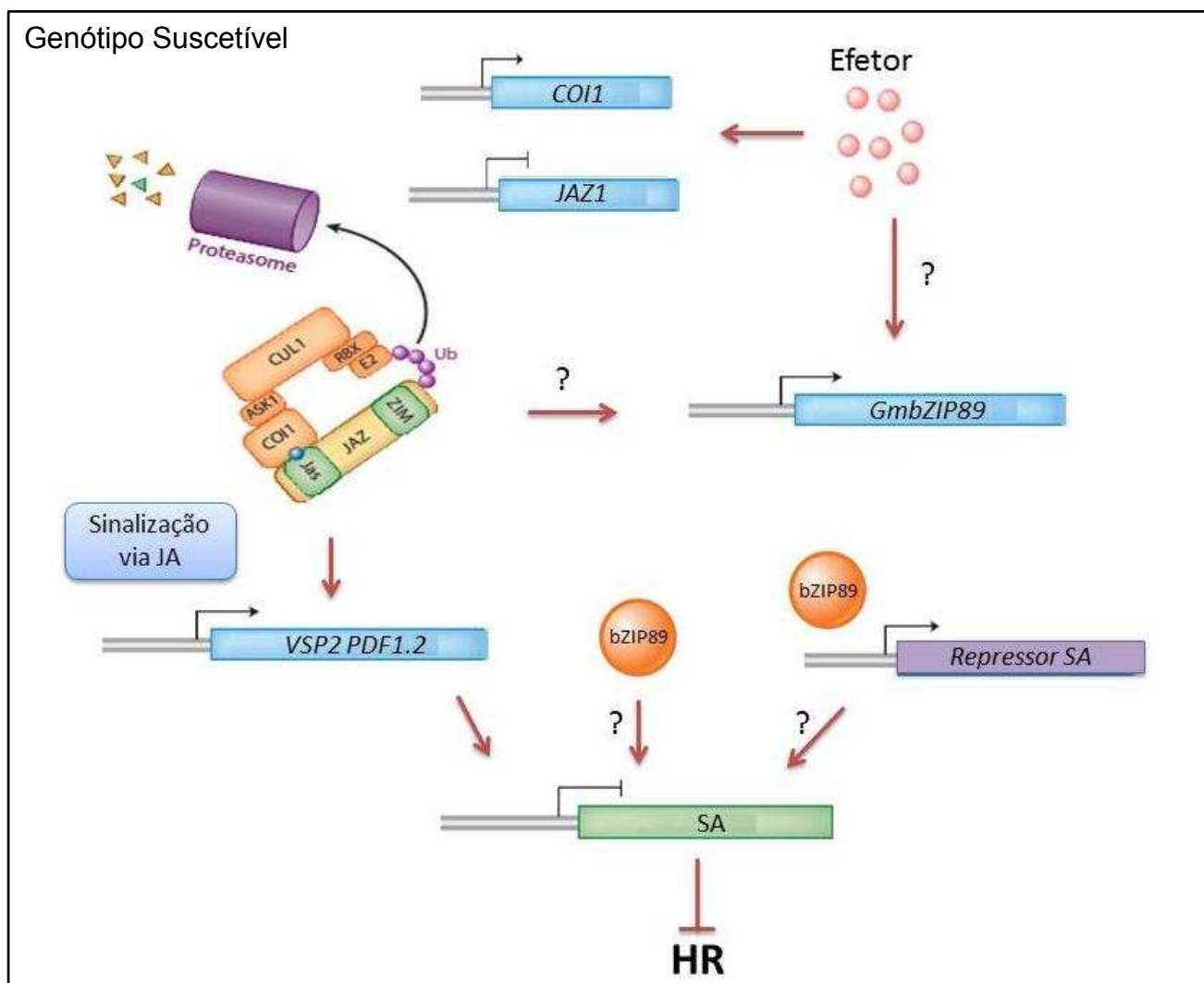
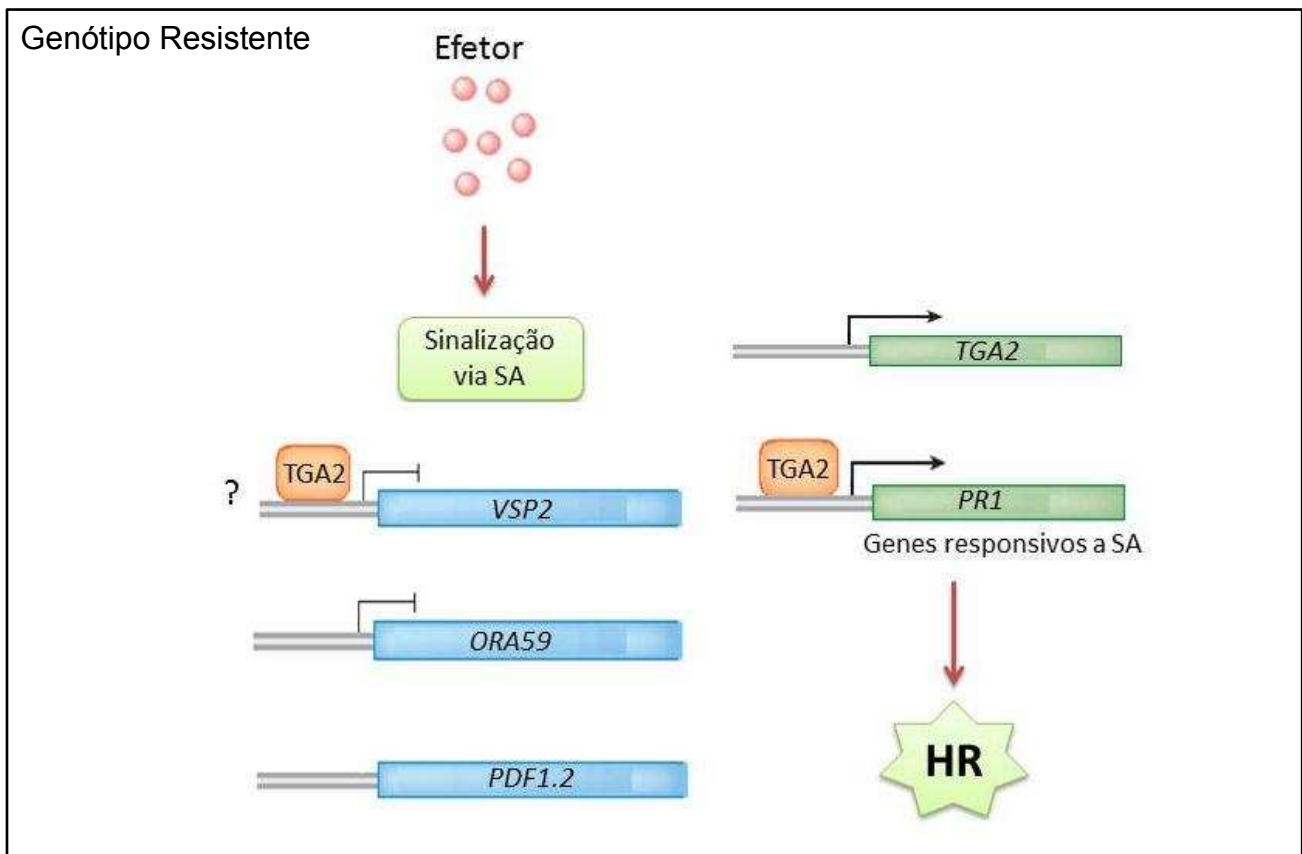


Figura 6: Modelo esquemático da sinalização mediada em resposta à infecção por *P. pachyrhizi* em soja nas linhagens resistente e suscetível

7 – REFERÊNCIAS

- Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., De Souza, G. B., Barros, V. A., Fietto, L. G. (2013). Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7815-7828.
- Alves, M. S., Soares, Z. G., Vidigal, P. M., Barros, E. G., Poddanosqui, A. M., Aoyagi, L. N., Fietto, L. G. (2015). Differential expression of four soybean bZIP genes during *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Functional & integrative genomics*, 1-12.
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular plant*, 8(4), 521-539.
- Campe, R., Loehrer, M., Conrath, U., Goellner, K. (2014). *Phakopsora pachyrhizi* induces defense marker genes to necrotrophs in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 87, 1-8.
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W. P., Halkier, B. A., Loake, G. J., Doerner, P., Lamb, C. (1997). Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The EMBO journal*, 16(4), 726-738.
- Franco-Zorrilla, J. M., López-Vidriero, I., Carrasco, J. L., Godoy, M., Vera, P., Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2367-2372.
- Garcia, A., Calvo, É. S., de Souza Kiihl, R. A., Harada, A., Hiromoto, D. M., Vieira, L. G. E. (2008). Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 545-553.
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U. W. E., Koch, E., Schaffrath, U. (2010). *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular plant pathology*, 11(2), 169-177.

- Hoefle, C., Loehrer, M., Schaffrath, U., Frank, M., Schultheiss, H., Hückelhoven, R. (2009). Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. *Phytopathology*, 99(3), 220-226.
- Huang, P. Y., Catinot, J., Zimmerli, L. (2015). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of experimental botany*, erv518.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 7(3), 106-111.
- Latchman, D. S. (2010). *Eucaryotic transcription factors*, edn5. San Diego.
- Li, S., Smith, J. R., Ray, J. D., Frederick, R. D. (2012). Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(1), 133-142.
- Liao, Y., Zou, H. F., Wei, W., Hao, Y. J., Tian, A. G., Huang, J., Chen, S. Y. (2008). Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 228(2), 225-240.
- Lim, C. W., Lim, S., Baek, W., Han, S. W., Lee, S. C. (2015). Expression and Functional Roles of the Pepper Pathogen-Induced bZIP Transcription Factor, CabZIP2, in Enhanced Disease Resistance to Bacterial Pathogen Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, (ja).
- Mengiste T. (2012). Plant Immunity to Necrotrophs. *Annual Reviews*. 50:13.1–13.28.
- Miles, M. R., Bonde, M. R., Nester, S. E., Berner, D. K., Frederick, R. D., Hartman, G. L. (2011). Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Plant disease*, 95(5), 577-581.
- Monteros, M. J., Missaoui, A. M., Phillips, D. V., Walker, D. R., Boerma, H. R. (2007). Mapping and confirmation of the ‘Hyuuga’ red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. *Crop Science*, 47(2), 829-834.

- Nagels Durand, A., Pauwels, L., Goossens, A. (2016). The Ubiquitin System and Jasmonate Signaling. *Plants*, 5(1), 6.
- Ndamukong, I., Abdallat, A. A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., Gatz, C. (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal*, 50(1), 128-139.
- Patil, V. S., Wuike, R. V., Thakare, C. S., Chirame, B. B. (1997). Viability of uredospores of *Phakopsora pachyrhizi* Syd. at different storage conditions. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, 22(2), 260-261.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 489-521.
- Pinheiro, G. L., Marques, C. S., Costa, M. D., Reis, P. A., Alves, M. S., Carvalho, C. M., Fontes, E. P. (2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*, 444(1), 10-23.
- Sree, K. S., Rajam, M. V. (2015). Genetic engineering strategies for biotic stress tolerance in plants. In *Plant Biology and Biotechnology* (pp. 611-622). Springer India.
- Schütze, K., Harter, K., Chaban, C. (2008). Post-translational regulation of plant bZIP factors. *Trends in plant science*, 13(5), 247-255.
- Singh, K. B., Foley, R. C., Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Van Loon, L. C. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760-770.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.

Wang, X., Wu, F., Liu, L., Liu, X., Che, Y., Keller, N. P., Yin, W. B. (2015). The bZIP transcription factor PfZipA regulates secondary metabolism and oxidative stress response in the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Fungal Genetics and Biology*.

Wang, Z., Libault, M., Joshi, T., Valliyodan, B., Nguyen, H. T., XU, D., Stacey, G., Cheng, J.; (2010). SoyDB: a knowledge database of soybean transcription factors. *Plant Biology*, 10:14.

Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D. G. O., Yoshida, K., Dong, S., Kamoun, S. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 77, pp. 235-247). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yan, S., & Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current opinion in plant biology*, 20, 64-68.

Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y., Shirasu, K. (2016). The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annual review of plant biology*, 67, 643-667.

Zhang Y., Zhang G., Dong Y., Guo J., Huang L., Kang Z.; (2009). Cloning and Characterization of a MBF1 Transcriptional Coactivator Factor in Wheat Induced by Stripe Rust Pathogen. *ACTA Agronomica Sinica*, v.35:1, p.11-17

Zhang, N., Liu, D., Zheng, W., He, H., Ji, B., Han, Q., Chen, C. (2014). A bZIP transcription factor, LrbZIP1, is involved in *Lilium regale* Wilson defense responses against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *Genes & Genomics*, 36(6), 789-798.