

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA DA SOJA À  
FERRUGEM ASIÁTICA E ANÁLISE TRANSCRICIONAL NA  
INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

**Danielle Cristina Gregorio da Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Orlando Di Mauro**

**Co-orientador: Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SP

Fevereiro de 2008

S586m Silva, Danielle Cristina Gregorio da  
Mapeamento de genes de resistência da soja à ferrugem asiática e análise transcricional na interação patógeno-hospedeiro / Danielle Cristina Gregorio da Silva. -- Jaboticabal, 2008  
xiii, 153 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008  
Orientador: Antonio Orlando Di Mauro  
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, José Baldin Pinheiro, Francismar Correa Marcelino, Ricardo César de Paula  
Bibliografia

1. *Glycine max*. 2. *Phakopsora pachyrhizi*. 3. Genes de resistência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DANIELLE CRISTINA GREGORIO DA SILVA** - nascida em Toledo-PR, em 02 de outubro de 1978. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, em Londrina-PR (conclusão em 1999) e mestrado em Genética e Melhoramento pela mesma instituição (conclusão em 2002). É docente nas Faculdades Luís Meneghel, em Bandeirantes-PR (desde 2002), onde ministra as disciplinas 'Genética Humana e Evolução', para o curso de Enfermagem, e 'Genética Molecular' e 'Evolução' para o Curso de Ciências Biológicas. Foi membro da comissão executiva do colegiado do curso de Ciências Biológicas nas Faculdades Luís Meneghel (2004) e atualmente é membro da Comissão Coordenadora de Concurso Público na mesma instituição.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Drs. Ricardo Vilela Abdelnoor, Naoki Yamanaka, Alexandre Nepomuceno e Antônio Orlando Di Mauro, pelo incentivo e orientação.

Aos membros da banca examinadora Drs. Francismar C. Marcelino, José Baldin Pinheiro, Rinaldo C. de Paula e Manoel Victor F. Lemos, por dedicarem seu precioso tempo na melhoria deste trabalho.

Aos pesquisadores da Embrapa Drs. Álvaro M. R. Almeida, Eliseu Bineck, Carlos A. A. Arias e Rodrigo L. Brogin, pelo apoio técnico-científico e incentivo.

Aos co-executores deste trabalho: André, João, Lívia, Luana, Adriana, Selma, Noelle, Renata e Rodrigo. Sem seus esforços a conclusão deste não teria sido possível.

A Lizandra L. Catelli e Noelle G. L. Torres, pela revisão da tese e pelo imenso apoio.

A todo o pessoal do laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja e aos amigos da FALM, pelo auxílio técnico, apoio emocional e amizade.

À diretoria da FALM, chefes de departamento Sandremir e Luci, e coordenadores de curso Fabiano e Ana Cecília, pelo apoio durante minha ausência, suprimindo minhas faltas na instituição durante a realização do doutorado.

Aos colegas de Jaboticabal, em especial a Daniela, Thaiza, Morcelli, Fernanda, Débora e Franco, pela carinhosa recepção, amizade e auxílio.

Ao pessoal da Universidade Estadual de Iowa, em especial a Martijn Van De Mortel, Steven A. Witham e Thomas J. Baum, pela recepção, orientação e apoio.

Aos amigos brasileiros de Iowa, em especial a Isabel e Emerson. Vocês são parte de minha família.

A Eliana Lemos e à equipe do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da UNESP-Jaboticabal, pela parceria na execução do experimento de microarranjos.

A EMBRAPA, UNESP, JIRCAS, CAPES, CNPQ e FINEP, pelo apoio financeiro, concessão de bolsas e disponibilização de estrutura física para a realização deste trabalho.

Ao meu noivo, Fernando. Sem sua compreensão, apoio, incentivo e amor, o caminho teria sido muito mais difícil.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Pág.
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 O Agronegócio da Soja no Brasil.....	03
2.2 A Ferrugem Asiática da Soja.....	05
2.3 Disseminação e Controle da Ferrugem Asiática da Soja.....	09
2.4 Respostas Moleculares de Defesa Mediadas por Genes de Resistência.....	11
2.5 Mapeamento Genético de Genes de Resistência.....	18
2.6 Métodos de Análise da Expressão Gênica Diferencial em Situação de Doença.....	23
2.7 Estudos Moleculares da Resistência da Soja à Ferrugem Asiática.....	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO MOLECULAR DE DOIS LOCOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	48
Resumo.....	48
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	51
Material Vegetal.....	51
Inoculação e Avaliação.....	51
Extração de DNA e Estratégia de Mapeamento.....	52
Análise dos Dados.....	53
Resultados.....	53

Avaliação Fenotípica.....	53
Amplificação de SSR e Análise de Ligação.....	54
Discussão.....	57
Referências.....	60
<b>CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA SOJA ATIVADOS</b>	
<b>DURANTE INTERAÇÃO COM A FERRUGEM ASIÁTICA.....</b>	<b>67</b>
Resumo.....	67
Introdução.....	67
Material e Métodos.....	70
Inoculação e Delineamento Experimental.....	70
Construção das Bibliotecas Subtrativas de cDNA.....	72
Sequenciamento e Análise de ESTs.....	73
Construção dos Microarranjos de cDNA.....	75
Marcação Fluorescente dos cDNAs-Alvo.....	75
Desnaturação e Hibridização.....	76
Obtenção das imagens e Análise dos Dados.....	77
Resultados e Discussão.....	78
Caracterização das Bibliotecas Subtrativas.....	80
Obtenção e Caracterização do Conjunto Completo de Sequências Únicas.....	83
Análise de Expressão Gênica.....	90
Rotas Metabólicas Potencialmente Ativadas em Resposta à Ferrugem Asiática.....	91
Proteínas com Estrutura Análoga a Genes de Resistência.....	96
Sinalização das Respostas de Defesa Mediada por Proteínas.....	96
Sinalização Hormonal.....	97
Mudanças na Expressão Gênica Controladas ao Nível Transcricional e Traducional.....	98
Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	99
Indução de Morte Celular.....	100

Degradação Protéica Associada à Via Ubiquitina/Proteossomo.....	100
Chaperonas.....	102
Produção de Fitoalexinas.....	102
Proteínas Antimicrobianas.....	103
Reforço na Parede Celular.....	104
Alterações no Metabolismo de Aminoácidos.....	104
Alterações no Transporte de Substâncias.....	105
Senescência.....	107
Outras Rotas Metabólicas.....	107
Estratégia de Defesa Mediada pelo <i>Rpp2</i> .....	108
Referências Bibliográficas.....	111
CAPÍTULO 4 - IMPLICAÇÕES.....	125
APÊNDICE.....	129

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
Figura 1: Desenvolvimento de fungos biotróficos, como oídios e ferrugens.....	06
Figura 2: Sintomas de plantas suscetíveis e resistentes à ferrugem asiática da soja.....	08
Figura 3: Visão geral das vias de transdução de sinal que ativam e coordenam as respostas de defesa das plantas.....	18
Figura 4: Diagrama esquemático da SSH.....	27
CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO MOLECULAR DE DOIS LOCOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	48
Figura 1: Mapas de ligação das regiões genômicas do <i>Rpp2</i> (A) e <i>Rpp4</i> (B).....	56
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA SOJA ATIVADOS DURANTE INTERAÇÃO COM A FERRUGEM ASIÁTICA.....	67
Figura 1: Estratégia de subtração utilizada para a montagem das bibliotecas de cDNA.....	73
Figura 2: Lesões de ferrugem asiática da soja observadas através de microscópio estereoscópico na face abaxial de folha de soja aos 12 dias após a inoculação.....	80
Figura 3: Espécies mais representadas entre os similares encontrados no GenBank para as sequências das quatro bibliotecas e os respectivos números de similares encontrados.....	82
Figura 4: Padrão de co-expressão das sequências entre as quatro bibliotecas E024, E192, P024 e P192.....	84
Figura 5: Classificação das supostas funções gênicas das ESTs das bibliotecas E024, E192, P024 e P192.....	89
Figura 6: Potencial estratégia de defesa mediada pelo gene <i>Rpp2</i> .....	110

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO MOLECULAR DE DOIS LOCOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	48
Tabela 1: Análise de qui-quadrado da segregação fenotípica quanto à resistência à ferrugem asiática da soja (geração F <sub>2:3</sub> ) e marcadores SSR (geração F <sub>2</sub> ) nas populações de mapeamento do <i>Rpp2</i> e do <i>Rpp4</i> .....	55
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA SOJA ATIVADOS DURANTE INTERAÇÃO COM A FERRUGEM ASIÁTICA.....	67
Tabela 1: Descrição de cada uma das quatro bibliotecas subtrativas e do conjunto completo de sequências quanto ao número, qualidade, agrupamento e redundância.....	82
Tabela 2: Funções moleculares expressas exclusivamente em cada uma das quatro bibliotecas e nas combinações de bibliotecas.....	86
Tabela 3: ESTs da soja inéditas identificadas neste trabalho.....	92
Tabela 4: Seqüências diferencialmente expressas segundo análise de microarranjos, para as quais foi encontrado um similar significativo (valor-e máximo 1E <sup>-8</sup> ).....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP - “Amplified Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado

Avr - avirulência

AVRDC - “Asian Vegetable Research and Development Center” ou Centro Asiático de Pesquisa e Desenvolvimento Vegetal

BAC - “Bacterial Artificial Chromosome” ou Cromossomo Artificial Bacteriano

BSR - “Brown Stem Rot” ou Podridão Marrom do Caule

BSA - “Bulked Segregant Analysis” ou Análise de Agrupamentos Segregantes

CC - “Coiled-Coil” ou Bobina Enrolada

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

E024 - amostra de folha do genótipo Embrapa 48 às 24 horas após inoculação

E192 - amostra de folha do genótipo Embrapa 48 às 192 horas após inoculação

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EST - “Expressed Sequence Tags” ou Etiquetas de Sequências Expressas

HR - “Hipersensitive Response” ou Resposta de Hipersensibilidade

ITS - “Internal Transcribed Sequences” ou Seqüências Internas Transcritas

JA - “Jasmonic Acid” ou Ácido Jasmônico

LOX - LipOXigenases

LRR - “Leucine Rich Repeats” ou Repetições Ricas em Leucina

MAS - “Marker Assisted Selection” ou Seleção Assistida por Marcadores

MPSS - “Massively Pararel Signature Sequencing” ou Sequenciamento de Assinaturas Massivamente Paralelo

NB - “Nucleotide Binding” ou Ligação a Nucleotídeo

NCBI - “National Center for Biotechnology Information” ou Centro Nacional (Americano) de Informação Biotecnológica

NO - “Nitric Oxide” ou Óxido Nítrico

ORF - “Open Reading Frame” ou Matriz Aberta de Leitura

P024 - amostra de folha do genótipo PI230970 às 24 horas após inoculação  
P192 - amostra de folha do genótipo PI230970 às 192 horas após inoculação  
PAL - “Phenilalanine Amonialyase” ou Fenilalanina Amonialiase  
PCR - “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase  
PR - “Pathogenesis Related” ou Relacionada à Patogênese  
QTL - “Quantitative Trait Locus” ou Loco de Característica Quantitativa  
R - “Resistance” ou Resistência  
RAPD - “Random Amplified Polymorphic DNA” ou DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso  
RB - “Reddish-Brown” ou Marrom-Avermelhado  
RFLP - “Restriction Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição  
RGAs - “Resistance Gene Analogs” ou Análogos de Genes de Resistência  
RILs - “Recombinant Inbred Lines” ou Linhagens Endogâmicas Recombinantes  
ROS - “Reactive Oxygen Species” ou Espécies Reativas de Oxigênio  
RPA - “Ribonuclease Protection Assay” ou Ensaio de Proteção de Ribonuclease  
SA - “Salicylic Acid” ou Ácido Salicílico  
SAGE - “Serial Analysis of Gene Expression” ou Análise Serial da Expressão Gênica  
SAR - “Systemic Acquired Resistance” ou Resistência Sistêmica Adquirida  
SCN - “Soybean Cist Nematode” ou Nematóide do Cisto da Soja  
SDS - Sódio Duodecil Sulfato  
Ser/Thr - “Serine/Threonine” ou Serina/Treonina  
SOD - Superóxido Dismutase  
SSC - Cloreto de Sódio/Sulfato de Sódio  
SSH - “Suppressive Subtractive Hybridization” ou Hibridização Subtrativa Supressiva  
SSR - “Simple Sequence Repeat” ou Sequência Simples Repetida  
TIR- “Toll-Interleukin Receptor” ou Receptor Toll-Interleucina  
USDA - “United States Department of Agriculture” ou Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA E ANÁLISE TRANSCRICIONAL NA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

**RESUMO** - A ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Quatro genes de resistência à ferrugem da soja distintos, *Rpp1* a *4*, foram descritos. O objetivo deste trabalho foi mapear geneticamente os genes de resistência *Rpp2* e *Rpp4* e identificar genes induzidos pela resposta de defesa mediada pelo gene *Rpp2*. Duas populações F<sub>2:3</sub> derivadas dos cruzamentos entre as linhagens resistentes PI 230970 (*Rpp2*) e PI 459025 (*Rpp4*) com a cultivar suscetível BRS 184, e marcadores SSR, foram utilizados neste estudo. Os locos *Rpp2* e *Rpp4* foram mapeados nos grupos de ligação J e G da soja, respectivamente, e os marcadores associados terão grande valor no processo de seleção assistida por marcadores para este caráter. Quatro bibliotecas de cDNA, derivadas de folhas do genótipo resistente PI 230970 (*Rpp2*) e do genótipo suscetível Embrapa 48, obtidas às 24 e 192 horas após a inoculação com esporos de *P. pachyrhizi*, foram geradas utilizando a metodologia SSH e tiveram seu padrão de expressão avaliado por análise de microarranjos de cDNA. Foram produzidas 3.807 sequências viáveis, das quais 670 foram sequências únicas, sendo 149 destas (22,2%) novas sequências da soja. A categoria funcional mais representativa para as quatro bibliotecas foi proteção celular, defesa e virulência. Apenas 65 transcritos foram diferencialmente expressos, estando eles envolvidos na geração de espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas antimicrobianas, morte celular e senescência, modificação, estabilização e degradação protéica, controle da expressão gênica e reforço de parede celular. Este trabalho permitiu a identificação de novas sequências da soja e contribuiu para a elucidação da estratégia de defesa mediada pelo gene *Rpp2*.

**Palavras-Chave:** *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, genes de resistência, transcrito.

## MAPPING OF GENES FOR RESISTANCE TO SOYBEAN RUST AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS ON THE PLANT-PATHOGEN INTERACTION

**SUMMARY** - Asian soybean rust is caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Four resistance genes to this disease, *Rpp1* to *4*, were previously identified. The aim of this work was to identify SSR markers linked to *Rpp2* and *Rpp4*, and to characterize genes up-regulated under soybean-Asian rust interaction. Two F<sub>2:3</sub> populations derived from the crosses PI 230970 (*Rpp2*) x BRS 184 and PI 459025 (*Rpp4*) x BRS 184, and SSR markers were used for mapping. *Rpp2* and *Rpp4* loci were mapped on the soybean linkage groups J and G, respectively, and the associated markers will be highly valuable to assist the introduction of these genes into soybean cultivars. Four cDNA libraries derived from leaf samples of the resistant genotype PI 230970 and the susceptible genotype Embrapa 48, obtained at 24 and 192 hours after inoculation, were generated using SSH and evaluated by cDNA microarray analysis. A total of 3,807 reliable ESTs were obtained, 670 from them were unique. The most representative functional category in all libraries was “cell rescue, defense and virulence”. Only 65 transcripts were differentially expressed among treatments, and were involved in the generation of reactive oxygen species, phytoalexins and antimicrobial proteins; cell death and senescence; protein fate; gene expression control; and reinforcement of cell wall. This work produced novel soybean sequences and contributed to the comprehension of the soybean mechanism of resistance to Asian rust mediated by *Rpp2*.

**Keywords:** *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, resistance genes, transcriptome.

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], produzindo 58,4 milhões de toneladas do grão na safra de 2006/07. A soja é a cultura que recebe maior investimento em área plantada no país e é um dos principais produtos nacionais de exportação (CONAB, 2007). No entanto, fatores bióticos e abióticos que limitam a produtividade dessa cultura colocam em risco toda essa riqueza. Atualmente, a principal doença que afeta a produção de soja no Brasil é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow.

Para a ferrugem asiática da soja, foram descritos na literatura quatro genes de resistência dominantes e independentes, denominados *Rpp1* a *4* (CHENG & CHAN, 1968; HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986). Quando a doença foi primeiramente detectada no Brasil, todos estes genes eram efetivos. Entretanto, em 2003, uma nova raça fisiológica de *P. pachyrhizi* quebrou a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3*. Somente o *Rpp2* e o *Rpp4* permanecem resistentes à raça fisiológica do fungo presente atualmente no Brasil.

Os métodos tradicionais utilizados para monitorar a transferência de genes a cultivares são demorados e trabalhosos. Nos últimos anos, a seleção facilitada por marcadores moleculares tem recebido muita atenção como método rápido e viável para o melhoramento da resistência a patógenos nas plantas cultivadas (FRANCIA et al., 2005). A utilização de perfis moleculares que indiquem a presença de um dado genótipo em um indivíduo eliminam o efeito ambiental no processo de seleção, aumentando a eficiência do programa de melhoramento. Ainda, quando diferentes locos codificam para o mesmo fenótipo, a utilização de marcadores moleculares possibilita a fácil identificação dos indivíduos portadores de mais do que um loco para o caráter, facilitando assim a piramidação destes em cultivares. Além de facilitar a piramidação

dos genes de resistência, a utilização de marcadores moleculares pode ainda permitir a localização genômica dos locos de resistência, o que cria a possibilidade de clonagem dos mesmos através da estratégia de clonagem posicional.

Recentemente, foram identificados marcadores SSR (“Simple Sequence Repeats” ou Sequências Simples Repetidas) ligados a locos de resistência à ferrugem asiática da soja, como exemplo o *Rpp1*, presente na PI200492, e o *Rpp* presente na cultivar japonesa Hyuuga, para o qual não foi determinada a relação com os genes *Rpp1* a *4* (HYTEN et al., 2007; MONTEROS et al., 2007). Entretanto, os locos ainda efetivos no Brasil *Rpp2* e *Rpp4* não foram mapeados até o momento. Ainda, pouco se sabe quanto ao mecanismo molecular de interação entre a soja e a ferrugem asiática e as complexas vias metabólicas que são ativadas em genótipos suscetíveis e resistentes em função desta interação, culminando na efetiva infecção da planta pelo patógeno ou no impedimento da proliferação do mesmo.

Tendo em vista o grande potencial de perdas na produção de soja que a ferrugem asiática representa para o país e considerando a necessidade de desenvolvimento de cultivares resistentes e da falta de conhecimentos sobre a interação entre soja e ferrugem, tornam-se prioritários o estudo e a pesquisa sobre a resistência a esta doença. A caracterização molecular dos genes de resistência e dos genes que com eles interagem poderá auxiliar o desenvolvimento de métodos eficientes de controle do fungo, além de promover um avanço na compreensão da reação da soja a outros patógenos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Agronegócio da Soja no Brasil

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de 5.000 anos, a soja [*Glycine max* (L.) Merrill] teve seu cultivo ignorado pelo Ocidente até a segunda década do século XX, quando os Estados Unidos da América (EUA) iniciaram sua exploração comercial (primeiro como forrageira e, posteriormente, como grão). Em 1940, no auge do seu cultivo como forrageira, foram cultivados, naquele país, cerca de 2 milhões de ha com tal propósito. A partir de 1941, a área cultivada para grãos superou a cultivada para forragem, cujo cultivo declinou rapidamente, até desaparecer em meados dos anos 60, enquanto a área cultivada para a produção de grãos crescia de forma exponencial, não apenas nos EUA, como também no Brasil e na Argentina, principalmente (BERTRAND et al., 1987; MORAIS & SILVA, 1996; MULLER, 1981).

A soja é um grão que dá origem a diversos produtos e subprodutos muito utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana, seu uso mais conhecido é como óleo refinado, mas também entra na composição de vários produtos embutidos, como salsichas, chocolates, temperos para saladas, maioneses, entre outros produtos. Sua proteína é a base de ingredientes como massas, produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas, alimentação para bebês e alimentos dietéticos. Também é muito usada pela indústria de adesivos e nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel e emulsão de água para tintas. Recentemente, sua utilização vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja já vem sendo testado por instituições de pesquisa brasileiras (EMBRAPA, 2007c).

A produtividade da soja brasileira, ao longo dos anos, evoluiu muito devido ao avanço das tecnologias de produção que foram adaptadas às condições tropicais e subtropicais do Brasil (HASSE & BUENO, 1996). Quando comparada com as demais

culturas brasileiras, a soja foi a que mais cresceu em área cultivada. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, houve um investimento em área plantada com a soja no Brasil de 20,7 milhões ha (44,8% da área cultivada total) na safra de 2006/07. A produção de soja foi de 58,4 milhões de toneladas (44,4% do total de grãos) na safra de 2006/07. A região Centro-Oeste foi a mais expressiva em área plantada com soja, representando 44,0% da área total plantada com soja no Brasil, em produtividade, atingindo patamares de 2.910 kg/ha, e produção, com 45,4% da produção brasileira dessa cultura. Entretanto, os mais altos valores de produtividade por Estado da Federação em 2006/07 foram alcançados por Roraima (o único Estado da Federação livre da ferrugem asiática), com 3.070 kg/ha (CONAB, 2007).

A soja sustenta o agronegócio brasileiro, sendo o maior produto nacional de exportação, com 31,9 milhões de toneladas de janeiro a setembro de 2007, correspondendo a 8,97 bilhões de dólares ou 21,8% do total de exportações de produtos agropecuários, segundo a CONAB. Neste mesmo período, o agronegócio trouxe um saldo positivo à balança comercial brasileira de 35,12 bilhões de dólares, sendo que o saldo positivo da balança comercial total foi de 30,93 bilhões de dólares. Em outras palavras, o saldo positivo gerado pelo agronegócio compensou o saldo negativo gerado pelos outros setores da economia; a participação do agronegócio na balança comercial total foi de 113,56%. A China tem sido nos últimos anos o maior importador da soja brasileira em grão, seguida dos países baixos. O Brasil também exporta o farelo e o óleo de soja, porém em quantidades menores que o grão (CONAB, 2007).

Segundo estimativas da safra 2007/08, feitas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos em novembro de 2007 (USDA, 2007), o Brasil continua sendo o segundo maior produtor mundial de soja com 62 milhões de toneladas, atrás apenas dos EUA, com 70,6 milhões de toneladas. Na terceira posição mundial encontra-se a Argentina, com 47 milhões de toneladas e em quarto a China, com 14,3 milhões de toneladas. Na safra anterior, de 2006/07, os EUA produziram 86,77 milhões, o Brasil 59 milhões, a Argentina 47,2 milhões e a China 16,2 milhões de toneladas de soja.

## 2.2 A Ferrugem Asiática da Soja

A soja pode ser infectada por duas espécies de fungo que causam ferrugem: o *Phakopsora meibomiae* (Arthur), nativo do continente americano, e o *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow, nativo do oriente, também denominado ferrugem asiática. A ferrugem americana ocorre em condições de temperaturas médias abaixo de 25°C e umidade relativa elevada, raramente causa perdas significativas e ocorre nas regiões dos Cerrados e Sul do País. Por outro lado, o fungo da ferrugem asiática é capaz de se desenvolver em temperaturas variando de 15 °C a 30 °C, pode se adaptar a qualquer região brasileira e pode causar severas perdas na cultura da soja (EMBRAPA, 2004).

O fungo *P. pachyrhizi*, um basidiomiceto da ordem Uredinales, foi descrito pela primeira vez no Japão, em 1902, e em 1914 já havia se espalhado por diversos países do sudeste da Ásia (HENNING & GODOY, 2006). Nas Américas, a doença chegou em 2001, mais especificamente no Brasil, Paraguai e Bolívia. No hemisfério norte, foi constatada somente em 2004, na Colômbia e nos Estados Unidos (SCHNEIDER et al., 2005).

As ferrugens são parasitas obrigatórios (biotróficos), isto é, não matam seus hospedeiros, mas desenvolvem estratégias efetivas para explorar células vivas como fontes de alimento. O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* inicia-se com uredósporos, oriundos de urédias, que atingem as folhas de soja na face superior ou inferior e germinam, se a temperatura for favorável e houver pelo menos seis horas de molhamento foliar. Dos uredósporos germinados forma-se um tubo germinativo, capaz de penetrar os tecidos foliares. Em uma infecção por *P. pachyrhizi*, a penetração ocorre diretamente pela epiderme intacta, mas pode também ocorrer pelos estômatos (ZAMBOLIN, 2006).

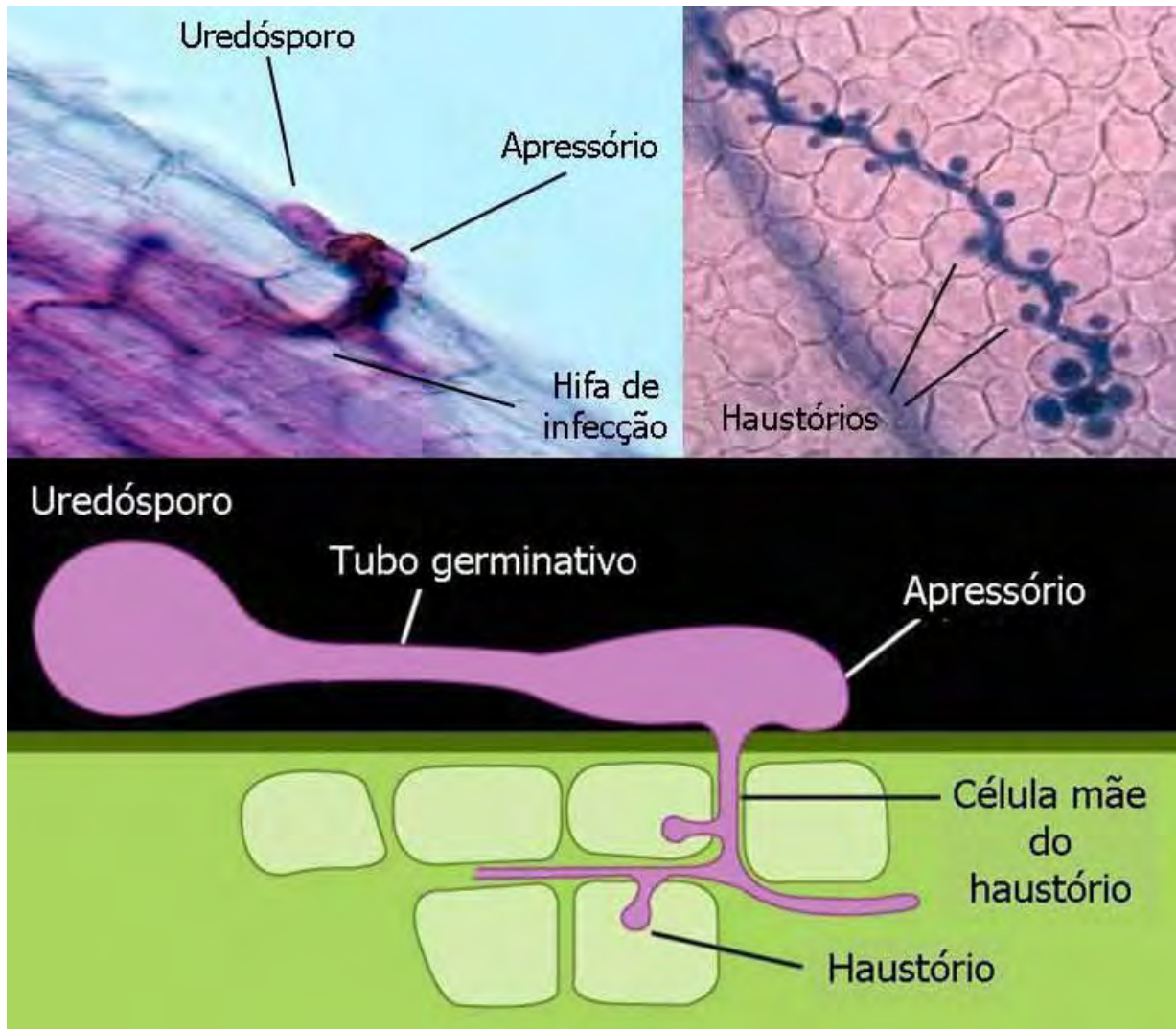


Figura 1: Desenvolvimento de fungos biotróficos, como oídios e ferrugens. A e C: Os uredósporos germinam formando um tubo germinativo que desenvolve um apressório; B e C: a hifa de infecção entra em contato com células do parênquima, se diferenciando em célula mãe do haustório, a qual produz o haustório dentro da célula vegetal. A partir deste ponto o patógeno começa a absorver nutrientes da planta. Adaptado de MENTABERRY (2007). As fotos são de *Peronospora parasitica* desenvolvendo-se em folha de *Arabidopsis thaliana*.

Nas ferrugens em geral, o tubo germinativo forma um apressório, uma estrutura que facilita a penetração da hifa. Dentro da folha, a hifa de infecção entra em contato

com uma célula do mesofilo e é formada uma célula mãe do haustório, a qual realiza a penetração da célula hospedeira e a diferenciação do haustório (Figura 1). Este é uma estrutura altamente ramificada, delimitada pela membrana celular da célula hospedeira, denominada de membrana extra-haustorial, uma matriz extra-haustorial e a parede celular do fungo. O haustório proporciona uma ampla superfície de contato com a célula hospedeira e através dele são adquiridas quantidades massivas de açúcares e aminoácidos por mecanismos de simporte a favor de gradiente de prótons. Propõe-se que a formação desta estrutura dependa de compostos voláteis, como o nonanal, decanal e acetato de hexenil, emitidos pelo hospedeiro (PANSTRUGA, 2003; MENDGEN et al., 2006).

As lesões produzidas por *P. pachyrhizi* são angulares, podendo apresentar coloração bronze (“tan”), indicando suscetibilidade, ou castanho-avermelhada (“reddish-brown” ou RB), caracterizando resistência (Figura 2) (BROMFIELD, 1984). Os primeiros sintomas são minúsculos pontos de coloração clara, e com o avanço da doença são formadas as urédias com minúsculos poros de onde são liberados os esporos. Nos genótipos suscetíveis, ocorre a senescência precoce, resultando em adiantamento do ciclo e prejuízo no enchimento dos grãos. O grau de esporulação nas lesões de genótipos suscetíveis é elevado, e em genótipos resistentes, baixo, quando existente. O período de latência (dias entre a inoculação e o aparecimento das lesões) e a viabilidade de esporos variam entre os genótipos (SOARES, 2007).

As lesões da ferrugem asiática podem surgir em 5 a 7 dias e os esporos em 9 a 12 dias. A infecção ocorre em umidade relativa superior a 60%. Chuvas constantes de baixa intensidade e temperaturas entre 18 e 25 °C por vários dias favorecem a epidemia da doença (ZAMBOLIN, 2006). As chuvas sempre possibilitam condições ideais para a infecção com ferrugem, seja por liberar os uredósporos, seja por fornecer água para a germinação, ou seja por manter a temperatura para a infecção próxima da ideal (BERGAMIN FILHO, 2006).

O fungo da ferrugem asiática da soja apresenta uma alta diversidade genética. Vinte raças de ferrugem asiática foram identificadas em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens no Japão (YAMAOKA et al., 2002), nove raças em 42

isolados em Taiwan (AVRDC, 1985) e 59 raças em 69 isolados na Tailândia (POONPOLGUL, 2004). No Brasil, embora não haja comprovação científica, devido à inexistência de hospedeiros diferenciadores de raças até o momento, admite-se que haja também inúmeras raças fisiológicas do patógeno em campos de soja (ZAMBOLIN 2006). A raça predominante atualmente nos campos de soja do norte do Paraná é muito similar à raça proveniente do Zimbábue, conforme atestam resultados de seqüenciamento de regiões ITS (“Internal Transcribed Sequences”) do genoma do fungo (Ricardo Vilela Abdelnoor, comunicação pessoal).



Figura 2: Sintomas de plantas suscetíveis e resistentes à ferrugem asiática da soja. A: face inferior de folha de planta suscetível. As lesões são de cor bronzeada (“tan”), ocorre senescência precocemente e há alta concentração de lesões com urédias esporulando. B: face inferior de folha de planta resistente. As lesões são de cor marrom-avermelhada (RB), a senescência é reduzida e as lesões possuem poucas ou nenhuma urédia com baixa esporulação. Foto: Danielle C. G. Silva, 2006.

A ferrugem asiática possui uma ampla gama de hospedeiros, que inclui além de *Glycine max*, outras espécies do gênero *Glycine* e outros gêneros de leguminosas. Uma coleção de 95 espécies de plantas hospedeiras, distribuídas em 42 gêneros da família Fabaceae (CALDWELL & MACLAREN, 2004) são hospedeiras da ferrugem. Assim, apesar do fungo ser biotrófico, o inóculo pode ser mantido nas épocas de entressafra, parasitando, além de soja voluntária, outras espécies de planta presentes no mesmo ambiente, como por exemplo, o feijão de lima (*Phaseolus vulgaris* var. *macrocarpus*), o desmódio (*Desmodium* sp.), o kudzu (*Pueraria lobata*) e a soja perene (*Neonotonia wightii*). Ainda, pode ser disseminado pelo vento a partir de cultivos de soja a quilômetros de distância.

### **2.3 Disseminação e Controle da Ferrugem Asiática da Soja**

Até o ano de 1999, a ferrugem asiática era limitada aos países orientais produtores de soja. A doença foi primeiramente detectada nas Américas em 2001, no sul do Brasil, Paraguai e Bolívia, e desde então tem se espalhado por todos os estados brasileiros produtores de soja, com exceção do estado de Roraima (EMBRAPA, 2007a). A ferrugem da soja é uma doença extremamente importante para as regiões tropicais e subtropicais, fato que a coloca, no quesito danos à produção, próxima aos modelos mais destrutivos de doença tropical (BERGAMIN FILHO, 2006). A situação da ferrugem está mais preocupante no Brasil devido ao fato da soja ser plantada como uma monocultura, as áreas de cultivo serem extensas e contínuas e o clima ser favorável ao desenvolvimento da doença, principalmente no Brasil central (HENNING & GODOY, 2006). A cada ano, a severidade da doença tem aumentado nas regiões de clima mais favorável e, conseqüentemente, também tem aumentado o custo do controle (YORINORI, 2006).

As perdas em grãos provocadas pela ferrugem asiática da soja totalizaram aproximadamente 4,5% da produção brasileira de soja em 2006/07, o que equivale a

2,67 milhões de toneladas de grãos ou US\$ 615,7 milhões, considerando o preço médio de US\$ 230,6 por tonelada de soja. Somando-se o custo da operação de controle, cuja média nacional ficou em 2,3 aplicações por ha, representando US\$1,58 bilhão, o custo total da ferrugem asiática no Brasil na safra 2006/07 é de US\$ 2,19 bilhões (EMBRAPA, 2007ab). Desde 2001 a 2006, a doença causou prejuízos acumulados (incluindo perdas de grãos, custos com o controle químico e perdas de arrecadação) estimados em US\$ 5,1 bilhões (YORINORI, 2006). Assim, o custo total com a doença de 2001 a 2007, foi de cerca de US\$ 7,3 bilhões.

Desde a detecção da doença no Brasil, o principal método de controle utilizado é a aplicação de fungicidas, os quais oneram substancialmente a produção, além de serem nocivos ao meio ambiente. Na safra de 2005/06, além da estiagem que afetou extensas áreas de soja, o controle da ferrugem nas regiões onde ocorreram chuvas foi dificultada por diversos fatores: ocorrência da doença desde o início do desenvolvimento da soja; dificuldade na identificação inicial; conceito arraigado da aplicação preventiva ou protetora nos estádios R1 a R3 (FEHR & CAVINNES, 1977), resultando em atraso no controle inicial; ineficiência na cobertura das folhas com fungicidas; falhas na tecnologia de aplicação e, finalmente, a dificuldade financeira dos produtores por falta de crédito para compra dos insumos. Nos cerrados brasileiros, diversas propriedades ficaram sem cultivo de soja, mesmo com arrendamentos gratuitos; alguns produtores trocaram herbicidas e inseticidas por fungicidas e, outros, semearam a soja sem condições de pulverizar, o que aumentou o potencial de inóculo na região (YORINORI, 2006).

Um dos métodos mais promissores de controle é o uso de resistência e/ou tolerância genética. Existem quatro genes R dominantes e independentes que conferem resistência à ferrugem asiática descritos na literatura: *Rpp1*, encontrado na PI 200492 (CHENG & CHAN, 1968), *Rpp2*, encontrado na PI 230970 (HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977), *Rpp3*, encontrado na PI 462312 (BROMFIELD & HARTWIG, 1980) e *Rpp4*, encontrado na PI 459025 (HARTWIG, 1986). Além destes genes, em vários outros genótipos foram encontrados locos de resistência para os quais não se sabe a relação com os genes previamente descritos. Uma avaliação de mais de 1000

acessos do banco de germoplasma da Embrapa Soja, Londrina-PR, quanto à resistência à ferrugem asiática, revelou 64 linhagens avançadas e cultivares brasileiras com níveis variáveis de resistência/tolerância (YORINORI & NUNES JUNIOR, 2007). Em outro trabalho, uma avaliação de 263 acessos japoneses e chineses, resultou num total de nove variedades resistentes, tolerantes ou parcialmente tolerantes (PASSIANOTTO et al., 2007). Em outra análise, mais ampla, 16.595 acessos do banco de germoplasma do USDA, na Universidade de Illinois, foram avaliados quanto à resistência à ferrugem (MILES et al., 2006). Este trabalho resultou em 805 genótipos promissores como fontes de resistência à ferrugem asiática. No momento, não existem cultivares resistentes/tolerantes à ferrugem asiática disponíveis para a produção de grãos no Brasil. Entretanto, a Fundação MT e a Embrapa divulgaram a disponibilização de variedades resistentes para as safras 2009/2010 e 2010/2011, respectivamente (NÓRCIO, 2007; AGÊNCIA DA NOTÍCIA, 2008).

#### **2.4 Respostas Moleculares de Defesa Mediadas por Genes de Resistência**

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. Embora as plantas, na natureza, estejam normalmente expostas a um número incalculável de patógenos, a resistência das mesmas mostra-se como regra, enquanto que a suscetibilidade mostra-se como exceção (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

O patógeno falha em se estabelecer em uma planta devido a uma entre três possíveis razões: a planta é incapaz de suportar os requerimentos fisiológicos de um patógeno potencial e, portanto, não pode ser considerada um hospedeiro; a planta possui barreiras estruturais pré-formadas ou compostos tóxicos que impedem o desenvolvimento do patógeno, novamente sendo considerada uma planta não-hospedeira; e a planta reconhece o ataque do patógeno, quando são ativados

mecanismos de defesa que impedem a proliferação do mesmo. Estes três tipos de interação são ditas incompatíveis, mas somente a última depende da indução de resposta na planta (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

A resposta de defesa induzida por genes de resistência raça-específicos, particularmente aquelas envolvendo parasitas biotróficos, é frequentemente explicada pela teoria gene-a-gene. O reconhecimento de um patógeno resulta da interação direta do produto de um gene *R* (de resistência), geralmente dominante, com o produto do gene *Avr* (de avirulência) correspondente do patógeno (FLOR, 1971). O reconhecimento da proteína *Avr* leva a uma cascata de eventos de sinalização que irá ativar genes da célula vegetal hospedeira, resultando em uma rápida resposta de defesa.

A maioria dos genes *R* codificam para cinco classes principais de proteínas de resistência: proteínas com domínio transmembrana e Repetições Ricas em Leucina (“Leucine Rich Repeats” ou LRR) localizadas no lado extracelular; proteínas com sinal transmembrana ligado a um domínio citoplasmático ‘bobina enrolada’ (“coiled-coil” ou CC); proteínas com domínio citoplasmático serina/treonina quinase (“Serine/Threonine” ou Ser/Thr) provavelmente associadas a membrana; proteínas com domínio citoplasmático Ser/Thr quinase, domínio transmembrana e LRR; e proteínas citoplasmáticas com domínio de ligação a nucleotídeo (“Nucleotide Binding” ou NB) associado a LRR (NB-LRR) (DANGL & JONES, 2001). A classe NB-LRR pode ser subdividida com base na composição da região amino-terminal dos genes. Muitos têm um domínio com homologia aos domínios intracelulares de sinalização “Toll” de drosófila e receptores de interleucina “(IL)-1” de mamíferos, sendo chamados de TIR (“Toll-Interleukin Receptor”). Os genes com esta característica amino-terminal são denominados TIR-NB-LRR. Outros genes contêm domínios CC na região amino-terminal, sendo chamados de CC-NB-LRR (DANGL e JONES 2001). Apesar destas serem as classes mais importantes, foram encontrados genes de resistência apresentando outras estruturas, como o *Hm1* de milho, cujo produto é uma toxina HC redutase (JOHAL & BRIGGS, 1992), e o *RGA1* de arroz, cujo produto possui domínio de proteína G (ASSMANN, 2005), e outros.

O reconhecimento das proteínas Avr pelas proteínas R em interações entre plantas e patógenos biotróficos possivelmente ocorre no citoplasma. As proteínas AvrL567 da ferrugem do linho (*Melampsora lini*), as quais são expressas em haustórios e contêm peptídios sinais, sugerindo sua secreção na matriz extra-haustorial, são reconhecidas por proteínas R citoplasmáticas do tipo NB-LRR. Este fato sugere a existência de um mecanismo específico de translocação que envie estas proteínas através da membrana extra-haustorial para dentro do citoplasma da célula hospedeira (CATANZARITI et al., 2006). Além deste dado, uma proteína de função desconhecida secretada pelo haustório da ferrugem da fava *Uromyces fabae* foi imunolocalizada no citoplasma e no núcleo da célula hospedeira, comprovando a possibilidade de que proteínas Avr expressas nos haustórios sejam transportadas para dentro das células vegetais hospedeiras (KEMEN et al., 2005). Apesar destas e de outras evidências, o modo pelo qual esse processo ocorre ainda é desconhecido (ELLIS et al., 2006).

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

O principal componente da resposta de defesa ativada pela interação entre o produto do gene *R* e o produto do gene *Avr* correspondente é a Resposta de Hipersensibilidade ("Hipersensitive Response" ou HR). A HR é definida com a morte das células do hospedeiro dentro de poucas horas após o contato com o patógeno. Em interações com patógenos biotróficos, os quais desenvolvem íntima associação com as células do hospedeiro através dos haustórios, a morte celular priva o patógeno do acesso a nutrientes, controlando seu desenvolvimento. A HR é uma resposta de defesa local, ativada somente nos pontos de contato entre a planta e o patógeno. As células mortas neste processo contêm altas concentrações de moléculas antimicrobianas e, por isso, não são subsequentemente atacadas por patógenos necrotróficos. A morte celular na HR parece resultar de dois processos principais: a produção de espécies reativas de

oxigênio, as quais são tóxicas para a célula e levam à morte celular, e a ativação de um processo de morte celular programada (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

As espécies reativas de oxigênio (“Reactive Oxygen Species” ou ROS) correspondem a uma das primeiras respostas ativadas em muitas interações incompatíveis. Existem inúmeras fontes potenciais de ROS: as fontes protoplásticas, representadas pelas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos; as NADPH oxidases e as superóxido sintases NADH-dependentes da membrana celular; e fontes apoplásticas de geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), incluindo peroxidases, amino oxidases e oxalato sintases. Em células de feijão, o peróxido de hidrogênio parece ser originado de uma peroxidase ligada a parede celular em um sistema de três componentes, requerendo fluxo de íons e levando à alcalinização extracelular e à liberação de moléculas redutoras, como os tióis (BOWEL et al., 2002).

Os ânions superóxido ( $O_2^-$ ), gerados na membrana ou nos protoplastos e secretados ao ambiente extracelular, seriam rapidamente dismutados de um modo não enzimático ou através da ação da superóxido dismutase (SOD), produzindo peróxido de hidrogênio. Este, por não ser eletricamente carregado, pode atravessar facilmente a membrana plasmática, atingindo o ambiente intracelular. Os ânions superóxido e o peróxido de hidrogênio não são muito reativos, mas podem ser convertidos aos radicais altamente destrutivos hidroxiperoxil ( $HO_2$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ), respectivamente, sendo este último formado na presença de íons  $Fe^{2+}$ . Todas estas ROS podem resultar em dano considerável ao hospedeiro e ao patógeno, ao reagirem com proteínas, reduzindo a atividade de enzimas; com lipídeos, desestabilizando as membranas; e com o DNA, podendo causar mutações (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

As ROS, além de desencadearem a morte celular vinculada à HR e controlarem o desenvolvimento do patógeno, ainda: reforçam a parede celular, uma vez que peróxido de hidrogênio é essencial para a formação de precursores de lignina, e radicais de oxigênio podem oxidar as glicoproteínas da parede celular, as quais são então ligadas à mesma através de ligações cruzadas; ativam uma cascata de sinalização mediada pelo ácido salicílico (“Salicylic Acid” ou SA), uma vez que o peróxido de hidrogênio aumenta a atividade da enzima BA2-H envolvida na biossíntese

do SA; ativa mecanismos de proteção celular contra sua própria toxicidade; e levam à alteração do potencial redox na célula, o qual é conhecido por ativar fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e o AP-1, assim desempenhando uma atividade de sinalização (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

Como um resultado do acúmulo de ROS, são ativados mecanismos de proteção celular contra os seus efeitos destrutivos. Entre estes mecanismos estão a produção de SODs; o ciclo do ascorbato/glutathione, que remove as ROS dos protoplastos; a produção de catalases que convertem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> nos peroxissomos e glioxissomos, entre outros (RESENDE et al., 2003).

O óxido nítrico (“Nitric Oxide” ou NO) é outra importante molécula que se acumula durante interações incompatíveis. O NO pode auxiliar a formação da HR por potencializar a indução da morte celular mediada por ROS. É possível que as ROS e o NO reajam formando o altamente tóxico peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), mas esta idéia ainda deve ser esclarecida (GRANT & LOAKE, 2000).

Um tipo de reforço da parede celular que ocorre rapidamente em resposta à invasão fúngica é a formação de papilas. Elas são formadas imediatamente abaixo do sítio de penetração da hifa de infecção, bloqueando a penetração fúngica das células hospedeiras (BAYLES et al., 1990). É considerada a possibilidade das papilas, ao invés de desempenharem uma função antagônica ao patógeno fúngico, serem induzidas por ele para auxiliar a penetração. A deposição de calose, as anteriormente citadas ligações cruzadas de glicoproteínas à parede celular e lignificação adicional, entre outros, são modificações da parede celular que foram relatadas como parte das respostas iniciais ou tardias ativadas em interações incompatíveis (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

A produção de ácido salicílico (“Salicylic Acid” ou SA), ácido benzóico (“Benzoic Acid” ou BA), etileno e de ácido jasmônico (“Jasmonic Acid” ou JA), está relacionada à resposta a fitopatógenos e insetos. Em locais em que ocorre a incompatibilidade mediada pelo reconhecimento R-Avr, níveis elevados de SA garantem que respostas de defesa, como a indução de genes PR, sejam ativadas, inibindo o desenvolvimento do patógeno. Uma proteína envolvida na produção de SA em plantas é a fenilalanina

amonialiasa ("phenilalanine amonialyase" ou PAL), a qual tem sua produção aumentada após ataque com fungos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Entretanto, a forma mais observada de produção de SA envolve a liberação de BA, que induz a expressão de um citocromo P450 monoxigenase (BA2-H), o qual converte BA em SA. A atividade de BA2-H é fortemente aumentada após HR (LÉON et al., 1995).

O etileno e o JA são moléculas sinalizadoras envolvidas na resposta de defesa a estresses bióticos e abióticos. Eles induzem à expressão de compostos antimicrobianos não induzidos por SA. Acredita-se que estas moléculas atuem em uma cascata antagonista à cascata envolvendo SA, embora possa haver cruzamento entre estas duas rotas de sinalização (DONG, 1998). Alguns exemplos do papel do SA, JA e etileno são dados a seguir.

Os transcritos de inúmeros genes PR acumulam dentro de minutos a horas do ataque pelo patógeno. Geralmente os mesmos genes são induzidos em interações compatíveis e incompatíveis, entretanto mais fraca e vagarosamente nas interações compatíveis. Algumas proteínas PR são quitinases e glucanases, enzimas que degradam polissacarídeos estruturais das paredes das células fúngicas e provavelmente reduzem o crescimento fúngico. O etileno e o SA parecem agir sinergicamente levando ao aumento das proteínas PR. Outras proteínas PR, como as lipoxigenases (LOX), geram moléculas sinalizadoras secundárias tais como JA e peróxidos lipídicos, e produzem metabólitos secundários tóxicos voláteis e não voláteis. As defensinas são também proteínas com atividade antimicrobiana. A via de sinalização que controla o acúmulo de defensinas é mediada por etileno e JA (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

As fitoalexinas são um grupo de metabólitos secundários quimicamente diverso que se acumula em torno do local de infecção e apresenta atividade antimicrobiana. Os isoflavonóides constituem um grupo de fitoalexinas comuns em leguminosas. Embora as fitoalexinas acumulem-se em concentrações tóxicas aos patógenos em bioensaios, o significado destes compostos para a defesa da planta ainda não é bem compreendido (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Poucos minutos após o reconhecimento R-Avr, rotas complexas de sinalização são ativadas. Um elemento inicial comum dessas cascatas é a mudança transitória da permeabilidade iônica da membrana plasmática vegetal. A ativação dos genes *R* estimula a entrada dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$  na célula e a saída de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (NÜMBERGER & SCHEEL, 2001). O rápido acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico regula o complexo NADPH oxidase diretamente ou indiretamente, através de aumentada produção de NADPH pela proteína de ligação a  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulina. Assim, o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  estaria envolvido na produção de ROS (GRANT & LOAKE, 2000). Presume-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  também possa sinalizar outras reações de defesa.

Quando uma planta sobrevive ao ataque de um patógeno, muitas vezes mostra um aumento na sua resistência a ataques subsequentes em qualquer outra região não atacada e apresenta proteção contra uma variedade de espécies de patógenos. O fenômeno chamado de resistência sistêmica adquirida ("Systemic Acquired Resistance" ou SAR) desenvolve-se após um período de vários dias após a infecção inicial (RYALS et al., 1996). A SAR parece resultar dos níveis aumentados de certos compostos de defesa já mencionados, incluindo quitinases e outras enzimas hidrolíticas. Apesar dos mecanismos de indução de SAR serem ainda desconhecidos, um dos sinais endógenos provavelmente é o SA. Embora o SA não seja um sinal móvel, o seu éster metil, o metil salicilato (no inglês MeSA), age como um sinal volátil que é transmitido para as partes distantes da planta e até para plantas adjacentes (SHULAEV et al., 1997). Este processo parece funcionar contra ataques de vírus, fungos, bactérias e nematóides.

Um resumo das principais vias de transdução de sinal necessárias para ativar e coordenar a indução localizada de respostas de defesa é apresentado na Figura 3. Apesar de uma série de mudanças metabólicas e estruturais em diversos patossistemas serem conhecidas, os mecanismos envolvidos na resposta de defesa da soja à ferrugem asiática ainda não foram elucidados. Estas informações serão muito úteis para a elaboração de estratégias efetivas de melhoramento de cultivares para a resistência durável.



impulsionou a pesquisa genômica de plantas durante o último quarto de século, e tornou o uso de marcadores moleculares uma área de pesquisa em ascensão na genética vegetal (GUPTA et al., 2005).

Os marcadores moleculares começaram a ser empregados na década de 80 e foram extensivamente utilizados para acessar a diversidade genética de populações, caracterizar germoplasmas, mapear locos de característica qualitativas e quantitativas, e auxiliar na introgressão de genes em cultivares, processo denominado Seleção Assistida por Marcadores (“Marker Assisted Selection” ou MAS). Os marcadores de DNA mais utilizados até o momento para estes propósitos podem ser classificados em dois tipos principais: marcadores moleculares loco não específicos dominantes, como o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA” - WILLIAMS et al., 1990) e o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism” - VOS et al., 1995); e marcadores moleculares loco-específicos codominantes, como o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism” - GRODZIKER et al., 1974) e os SSR (“Simple Sequence Repeats” - LITT & LUTTY, 1989). Apesar destes terem sido os mais utilizados, atualmente existem outros tipos de marcadores, como os SNPS (“Single Nucleotide Polymorphism”) e os ESTs-SSR (EST: “Expressed Sequence Tags” ou Etiquetas de Seqüências Expressas), os quais têm sido aplicados com sucesso no mapeamento de características importantes.

Os SSR ou microssatélites baseiam-se na amplificação via PCR (“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase) de seqüências simples repetidas utilizando iniciadores específicos complementares às regiões que flanqueiam essas seqüências. No genoma dos organismos eucariontes existem muitas seqüências repetitivas de DNA que se localizam em regiões de microssatélites. As seqüências de DNA que flanqueiam essas regiões contendo repetições curtas são conservadas dentro de uma espécie, permitindo a seleção de iniciadores de PCR que possam ser utilizados para amplificar os SSRs. Após a amplificação dessas regiões específicas, o polimorfismo no tamanho dos fragmentos obtidos é devido ao número diferente de repetições das seqüências simples (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Em um

estudo de SSR utilizando 34 espécies de plantas, o elemento repetido mais comum foi o dinucleotídeo AT (MORGANTE & OLIVIERI, 1993)

Os marcadores SSR são altamente polimórficos, abundantes e distribuídos por todo o genoma, e sua análise é passível de automação. Com o desenvolvimento e a publicação dos iniciadores para amplificação de SSRs da soja, marcadores para todos os grupos de ligação puderam ser mapeados (CREGAN et al., 1999; SONG et al., 2004). Em soja, os marcadores SSR têm sido muito utilizados para o mapeamento de genes específicos que determinam características agronomicamente importantes, como resistência a doenças e, também, para a identificação de locos de características quantitativas (“Quantitative Trait Loci” ou QTLs) de importância econômica, envolvidos na produtividade de grãos e na resistência genética a pragas e doenças (FRANCIA et al., 2005).

A grande disponibilidade de marcadores neutros, altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental, aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônomo, até mesmo para aquelas de longo ciclo de vida, como as florestais e as frutíferas. A construção de mapas de ligação tem como base a análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, é computadorizada. Programas como “Mapmaker” (LANDER et al., 1987), “Linkage 1” (SUITER et al., 1983), “Gmendel” (LIU & KNAPP, 1990) e GQMOL 9.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006), foram desenvolvidos para auxiliar na análise genética dos dados visando à construção de mapas genéticos (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

A seleção da população para mapeamento envolve a escolha de genitores, os quais devem ser suficientemente contrastantes para garantir o máximo de polimorfismo, e a determinação do tipo de população, sendo considerada uma etapa crítica para o sucesso da construção do mapa (STAUB et al., 1996). Diversos tipos de populações podem ser utilizadas para o mapeamento. Para espécies vegetais passíveis de autofecundação, como a soja, podem ser utilizadas as populações  $F_2$ ,  $F_3$  ou  $F_n$ , os duplo haplóides, as linhagens endogâmicas recombinantes (“Recombinant Inbred Lines” ou RILs) e populações derivadas de retrocruzamento. A utilização de população

$F_2$  tendo cada indivíduo uma progênie  $F_3$  individual ( $F_{2:3}$ ) tem as vantagens de facilidade e rapidez de obtenção e disponibilidade de informação sobre os três possíveis genótipos para um loco (AA, Aa, aa), o que aumenta a precisão dos componentes genéticos (SCHUSTER & CRUZ, 2004). Somente é possível identificar os indivíduos heterozigotos (Aa) para caracteres que apresentam herança de dominância completa (como a resistência à ferrugem asiática) quando a progênie de cada indivíduo  $F_2$  é avaliada. Se na progênie de um dado indivíduo  $F_2$  for observado somente o fenótipo dominante, este indivíduo é homozigoto dominante; se for detectado somente o fenótipo recessivo, o indivíduo  $F_2$  é homozigoto recessivo; mas, se houver segregação para os fenótipos dominante e recessivo, o indivíduo  $F_2$  é heterozigoto. Para garantir a confiabilidade deste teste de progênie, elas devem ser formadas por um número adequado de indivíduos. Para caracteres de herança monogênica completamente dominante, 15 indivíduos na progênie gera uma confiança de aproximadamente 98,7% na avaliação. Para se obter esta estimativa, utiliza-se a fórmula:  $n = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-P)}$ , onde “n” é o tamanho da população, “p” é a probabilidade de que o genótipo almejado ocorra (que, neste caso, é o genótipo recessivo, com probabilidade igual a 25%) e “P” é a probabilidade desejada de ocorrência de pelo menos um indivíduo com o genótipo almejado (RAMALHO et al., 2004). Populações  $F_{2:3}$  têm sido frequentemente utilizadas no mapeamento de uma série de genes em diversas culturas.

A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador empregado (TANKSLEY et al., 1988). O máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população  $F_2$  (ou  $F_{2:3}$ ) e marcadores codominantes (STAUB et al., 1996). O tamanho da população também é algo determinante para o sucesso do trabalho. O tamanho da população de mapeamento pode ser definido considerando-se a precisão desejada para a estimativa de frequência de recombinação. Quanto maior o tamanho da população, maior será a resolução do mapa e, conseqüentemente, menores frequências de recombinação poderão ser estimadas. Populações  $F_2$  com marcadores codominantes são aquelas que demandam o menor tamanho de população. Para populações  $F_2$  de cerca de 150 indivíduos avaliadas com marcadores codominantes, pode se obter frequências de

recombinação de 5%, num intervalo de confiança de 5% e num nível de confiança de 95% (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

A busca por marcadores ligados ao carácter que se pretende mapear é uma etapa decisiva no trabalho de mapeamento. Uma estratégia interessante é a análise de segregantes agrupados (“Bulked Segregant Analysis” ou BSA - MICHELMORE et al., 1991). Este método consiste na avaliação de dois grupos de indivíduos obtidos de pontos extremos da curva de distribuição do carácter em estudo. Espera-se que os alelos dos marcadores que estiverem associados aos alelos do carácter que está sendo mapeado estejam distribuídos de forma desigual entre os dois grupos, possibilitando sua detecção. A BSA tornou a identificação de marcadores moleculares ligados a caracteres de interesse um processo mais eficiente. Este método tem sido utilizado com sucesso na detecção de marcadores moleculares associados a genes de resistência a doenças (ZHAO et al., 2005).

Os caracteres mapeados devem distribuir-se de acordo com um padrão de segregação mendeliana. Este padrão pode ser verificado através do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). É recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (BEARZOTI, 2000).

A falta de aditividade das frequências de recombinação levou ao desenvolvimento das funções de mapeamento. Elas são utilizadas para converter frequências de recombinação, expressas em unidades de mapa (centiMorgan ou cM) em medidas de distância com propriedades mais interessantes para o ordenamento dos locos. As mais conhecidas são as de Haldane (HALDANE, 1919) e de Kosambi (KOSAMBI, 1944). A função de Haldane admite a independência das permutas nos intervalos adjacentes, enquanto a função de Kosambi considera a interferência.

Uma vez estimadas as frequências de recombinação e estabelecida a função de mapeamento, a etapa seguinte é formar os grupos de ligação contendo os marcadores ligados. Dois marcadores são considerados ligados quando a frequência de recombinação entre eles for inferior a um limite predefinido e/ou o LOD score (“Logarithm of ODDs” ou Logaritmo dos Nós) for inferior a um limite também predefinido.

A distância máxima de ligação utilizada como padrão em vários programas de mapeamento é 37,2 cM e o LOD score igual a 3,0. Um LOD score igual a 3 indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável que a de segregação independente (BEARZOTI, 2000; SCHUSTER & CRUZ, 2004).

## **2.6 Métodos de Análise da Expressão Gênica Diferencial em Situação de Doença**

A expressão de genes eucarióticos que produzem proteínas pode ser dividida em três etapas: 1) a transcrição de um filamento de pré-mRNA utilizando a seqüência de um gene como molde, 2) o processamento do pré-mRNA anterior à sua translocação para o citoplasma, 3) a tradução do filamento de mRNA em uma cadeia polipeptídica, e 4) as modificações pós-traducionais, incluindo o dobramento do polipeptídeo na conformação correta para sua atividade biológica e outras modificações, como a adição específica de grupos de carboidratos. A primeira etapa da expressão gênica tem sido a mais estudada com o objetivo de qualificar e quantificar um gene ou conjuntos de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo numa dada condição.

A coleção completa de mRNAs transcritos em uma célula, tecido ou órgão em um momento particular é denominada de transcritoma e o estudo dos mRNAs transcritos é denominado transcritômica (DALE & SCHANTZ, 2002). O estudo do transcritoma de uma célula ou tecido representa o primeiro passo na caracterização funcional de genes de interesse e identificação de locos corregulados. As metodologias utilizadas para estabelecer perfis transcricionais geralmente baseiam-se na geração de populações de cDNA a partir da população de mRNA expressa.

O primeiro grupo de técnicas de análise de transcritomas baseia-se nas várias formas de acessar a quantidade de um transcrito específico em uma dada amostra em um determinado momento. Dentre as técnicas que compõem este grupo destacam-se os “Northern Blots” (ALWINE et al., 1977), Ensaio de Proteção de Ribonuclease (“Ribonuclease Protection Assay” ou RPA - MELTON et al., 1984; WINTER et al.,

1985), Transcrição Reversa (“Reverse Transcription” ou RT) seguida de PCR em Tempo Real (“Real Time RT-PCR” - TaqMan - GIBSON et al., 1996) e Ensaio de Extensão de Iniciador (“Primer Extension Assay” - BOORSTEIN & CRAIG, 1989). O segundo grupo de técnicas se preocupa com a análise global de transcritos. Dentre as técnicas compreendidas neste grupo, é possível citar a Análise Serial da Expressão Gênica (“Serial Analysis of Gene Expression” ou SAGE - VELCULESCU et al., 1995), Seqüenciamento de Assinaturas Massivamente Paralelo (“Massively Pararel Signature Sequencing” ou MPSS - BRENNER et al., 2000) e Piroseqüenciamento (WEBER et al., 2007).

Um terceiro grupo de técnicas abrange a comparação de diferentes transcritomas e a ciência envolvendo estas técnicas pode ser chamada de transcritômica comparativa. Neste grupo, destacam-se as técnicas “Differential Display” (LIANG & PARDEE, 1992), “RNA fingerprinting” (WELSH et al., 1992), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado baseado em cDNA (cDNA-AFLP - BACHEM et al., 1996), “GeneFishing” (KIM et al., 2004), Hibridização Subtrativa (BAUTZ & REILLY, 1966; DIATCHENKO et al., 1996) e Microarranjos de DNA (SCHENA et al., 1995). Tais técnicas permitem isolar transcritos que sejam expressos em um dado tecido, fase do desenvolvimento ou condição, como, por exemplo, uma situação de doença sistêmica na planta, utilizando uma amostra controle como referência para comparação.

Dentre os métodos apresentados acima, a hibridização subtrativa é o único capaz de enriquecer uma população de cDNAs com transcritos diferencialmente expressos. O método foi primeiramente utilizado por BAUTZ & REILLY (1966) para purificar o mRNA do fago T4. A amostra que possui os transcritos de interesse é chamada testadora (“tester”) e aquela utilizada como controle é chamada referência (“driver”). Embora haja variações no método, a teoria básica por trás da subtração é a mesma: ambas as amostras de mRNA são convertidas a cDNA, os quais são postos para hibridizar; as seqüências híbridas são removidas e as restantes, não-hibridizadas, representam os genes que foram expressos na amostra testadora, mas não foram na referência. Logo, estes são os transcritos diferencialmente expressos entre as amostras (DALE & SCHANTZ, 2002; JI & CAI, 2004).

As metodologias tradicionais de hibridização subtrativa são de uso limitado, porque elas requerem grandes quantidades de mRNA inicial e produzem uma ínfima quantidade de cDNA ao final do processo, dificultando sua clonagem. A Hibridização Subtrativa Supressiva (“Suppressive Subtractive Hybridization” ou SSH - DIATCHENKO et al., 1996), um método baseado em PCR, contornou as limitações das técnicas anteriores, resultando em um enriquecimento de 1000 vezes na quantidade de transcritos diferencialmente expressos, sendo assim adequado à identificação de transcritos raros (JI & CAI, 2004)

Na SSH, o cDNA é sintetizado a partir de mRNA obtido das duas amostras que se pretende comparar: a testadora e a referência. A amostra testadora é subdividida em duas partes, sendo cada uma delas ligada a um adaptador diferente (a seqüência deste adaptador é complementar aos iniciadores que serão utilizados posteriormente para amplificação por PCR). Duas hibridizações são então realizadas. Na primeira, um excesso de cDNA referência é adicionado a cada amostra do testador. As amostras são então desnaturadas por calor e deixadas se complementar, gerando as moléculas tipo ‘a’, ‘b’, ‘c’ e ‘d’ em cada amostra (Figura 4). As moléculas tipo ‘a’ são significativamente enriquecidas com seqüências diferencialmente expressas, enquanto os cDNAs que não são diferencialmente expressos formam as moléculas tipo ‘c’ mediante complementação com o cDNA referência (DIATCHENKO e al., 1996).

Na segunda hibridização, as duas amostras da primeira hibridização são misturadas sem serem desnaturadas. Agora, somente os cDNA testadores unifilamentares subtraídos e equalizados podem se reassociar, formando um novo tipo de híbridos: as moléculas tipo ‘e’ (Figura 4). Estes novos híbridos serão amplificados por PCR, gerando a população de cDNAs enriquecida com seqüências diferencialmente expressas. As moléculas tipo ‘a’ e ‘d’ não podem ser amplificadas, por não possuírem o sítio de complementação dos iniciadores (Figura 4). Devido ao efeito de supressão da PCR, a maioria das moléculas tipo ‘b’ formam uma estrutura em grampo, que previne sua amplificação. As moléculas tipo ‘c’ possuem somente um sítio de complementação de primer, e são amplificadas linearmente. As moléculas tipo ‘e’ amplificadas podem ser

diretamente inseridas em um vetor T/A, o qual é adaptado para produtos de PCR, para a clonagem e obtenção de uma biblioteca subtrativa (DIATCHENKO e al., 1996).

A hibridização subtrativa tem sido muito empregada na identificação de transcritos ativados em situação de doença (DALE & SCHANTZ, 2002). Vários trabalhos têm sido publicados utilizando a SSH para identificar com sucesso transcritos diferencialmente expressos (AKOPIAN & WOOD, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2002; HEIN et al., 2004; DEGENHARDT et al., 2005; WANG et al., 2007; ZOUARI et al., 2007). Em alguns destes trabalhos, os cDNA clonados são impressos em micro ou macroarranjos e hibridizados com cDNAs-alvo adequados para a confirmação da expressão diferencial (YANG et al., 1999; ZENGH et al., 2004; RISHI et al., 2004; LI et al., 2007).

Na técnica de microarranjos de cDNA (SCHENA et al., 1995), seqüências de cDNA de milhares de genes são organizadas sobre lâminas de vidro. As duas populações de mRNA que se quer comparar são transcritas a cDNA, cada uma das quais na presença de nucleotídeos marcados com fluorocromos diferentes. A seguir, os cDNAs marcados são desnaturados, misturados na mesma proporção e hibridizados às sondas fixadas à lâmina. As lâminas são expostas à luz de comprimentos de onda apropriados e os sinais são registrados em imagens. A comparação entre as duas imagens geradas permite a identificação dos genes diferencialmente expressos. O advento da impressão robótica de sondas em alta densidade e da análise eletrônica de imagens tornou tecnicamente simples produzir tais arranjos e praticamente ilimitada a quantidade de seqüências que podem ser analisadas (DALE & SCHANTZ, 2002).

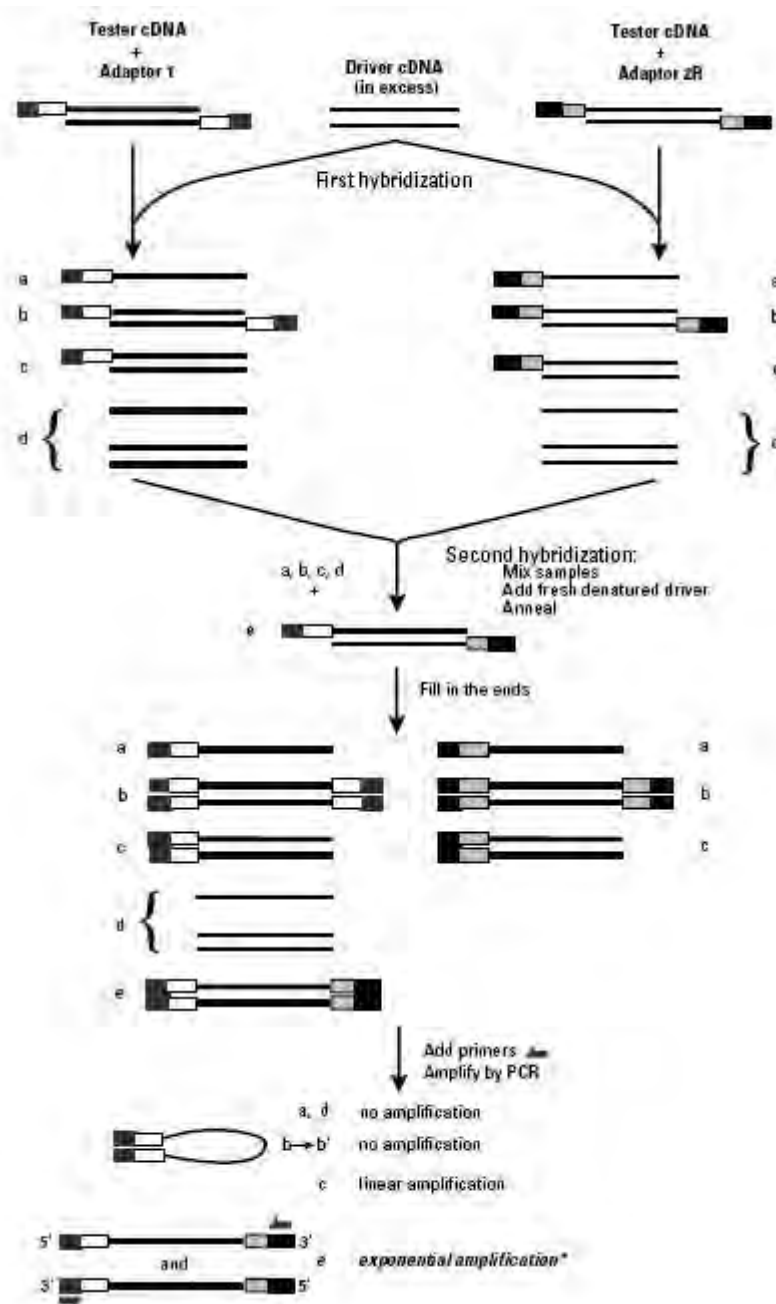


Figura 4: Diagrama esquemático da SSH. Linhas sólidas representam os cDNAs digeridos com *Rsa* I. Caixas preenchidas representam a parte externa do adaptador 1 e 2R, que são idênticas e complementares ao iniciador da primeira PCR. Caixas vazias representam a parte interna do adaptador 1 e são complementares ao iniciador interno 1 da segunda PCR. Caixas sombreadas representam a parte interna do adaptador 2R e são complementares ao iniciador interno 2R da segunda PCR (BD BIOSCIENCES, 2004).

## 2.7 Estudos Moleculares da Resistência da Soja à Ferrugem Asiática

Trabalhos de mapeamento dos locos de resistência à ferrugem asiática têm sido conduzidos. O locus *Rpp1* foi mapeado entre os marcadores SSR Sct\_187 e Sat\_164, à distância de 0,4 cM de ambos os marcadores, no grupo de ligação G da soja (HYTEN et al., 2007). Além do *Rpp1*, alelos identificados em outras variedades também foram mapeados. O loco identificado na cultivar japonesa Hyuuga foi mapeado entre os marcadores SSR Satt460 e Satt307, no grupo de ligação C2, a distâncias de 0,8 cM e 2,4 cM, respectivamente (MONTEROS et al., 2007). Nesta mesma região genômica, foi mapeado o loco presente na cultivar FT-2, localizando-se entre os marcadores SSR Satt460 e Satt079, a distâncias de 20,3 cM e 7,8 cM, respectivamente (BROGIN et al. 2004; POLIZEL et al., 2006). Segundo trabalho desenvolvido por GILLI et al. (2006), com base em análises de similaridade genética, o alelo presente na FT-2 pode ser o *Rpp3*. Esforços anteriores na Tailândia também localizaram um loco de resistência no grupo de ligação G, em uma associação estreita com os marcadores Satt012 and Satt472 (NUNTAPUNT et al., 2004), em genótipos de soja previamente submetidos a agentes mutagênicos. Não foi identificada a relação entre os locos presentes na Hyuuga, FT-2 e nas linhas mutagênicas tailandesas, e os genes *Rpp* descritos anteriormente. E até o momento, não foi publicado trabalho relatando o mapeamento dos genes *Rpp2* e *Rpp4*, os quais são os únicos, dentre os previamente descritos na literatura, a conferir resistência contra a raça fisiológica da ferrugem presente no Brasil.

Os genes de resistência podem estar distribuídos aleatoriamente pelo genoma ou em agrupamentos (“clusters”). Vários dos genes de resistência a fitopatógenos clonados até o momento residem em agrupamentos, indicando que um mecanismo genético comum esteja envolvido em sua evolução. Em geral, duplicações gênicas causadas por pareamento desigual seguido de recombinação e subsequente acúmulo de mutações de ponto, estão envolvidos na criação de novos genes de resistência e em seu agrupamento numa dada região genômica. A ligação genética de genes de resistência foi relatada em milho para o agrupamento de genes *Rp1*, em cevada para o

agrupamento de genes *Mla*, em alface para os locos *Dm*, em aveia para os genes *Pc* e em linho para os genes *L* (KANAZIN et al. 1996).

Com base no conhecimento das seqüências mais comumente encontradas nos genes de resistência, foi proposta e confirmada a existência de análogos de genes de resistência (“Resistance Gene Analogs” ou RGAs). Os RGAs são clonados por PCR utilizando iniciadores cuja seqüência é complementar a regiões conservadas nos genes de resistência. Em trabalho desenvolvido por KANAZIN et al. (1996) em soja, 19 RGAs foram clonados e mapeados nos grupos de ligação C2, D1, H, J, L, M, N1 e P.

Alguns trabalhos de genômica funcional da soja sob infecção com ferrugem asiática foram realizados recentemente. A análise de expressão gênica de uma cultivar americana de soja através de microarranjo de DNA revelou que a maioria dos genes que mudaram sua expressão em situação de infecção precoce foram genes de resposta de defesa (PANTHEE et al., 2007). Este trabalho, entretanto, foi conduzido utilizando um genótipo para o qual não se conhece a resposta à ferrugem, uma vez que as plantas inoculadas não apresentaram sintomas de infecção. A infecção foi dada como positiva através da amplificação de um fragmento específico do fungo nas amostras de cDNA das folhas inoculadas. Deste modo, não é possível relacionar os genes expressos diferencialmente com um mecanismo de resistência, mas sim com um mecanismo de resposta a infecção.

Em outro trabalho de análise de expressão gênica utilizando o mesmo microarranjo comercial (MORTEL et al., 2007), foram analisados dois genótipos de soja, a Embrapa 48 (suscetível) e a PI230970 (resistente, possuidora do gene *Rpp2*), no decorrer dos primeiros sete dias após a inoculação em intervalos variáveis de 6 h a 1 dia. Foram detectadas mudanças bifásicas distintas na expressão dos mRNAs, com um pico de expressão de genes relacionados à defesa dentro das primeiras 12 h após a infecção, em ambos os genótipos, e outro próximo de 96 h após infecção no genótipo suscetível e próximo de 72 h após infecção no genótipo resistente, indicando uma expressão gênica relativamente precoce nos mecanismos mediados pelo gene *Rpp2*.

Em ambos os trabalhos, a análise de microarranjos foi conduzida utilizando microarranjos de oligonucleotídeos comerciais (“Soybean Genome GeneChip Array”,

Affymetrix), os quais representam mais de 37.500 transcritos da soja. As sondas de oligonucleotídeos presentes no microarranjo comercial são restritas a certos germoplasmas e condições de cultivo, o que representa uma limitação da técnica. Apesar de terem sido incluídas na fabricação destes microarranjos oligonucleotídeos representando genes de resposta ao nematóide do cisto (*Heterodera glycines*) e à podridão da raiz (*Phytophthora sojae*), não foram representados genes de defesa a fungos biotróficos, para os quais as plantas apresentam mecanismos específicos de defesa. Assim, é provável que estes microarranjos não contemplem algumas ou várias das seqüências ativadas em interações compatíveis e incompatíveis entre soja e ferrugem asiática. Até o momento, não foram publicados trabalhos relatando a clonagem de genes envolvidos na reação da soja à ferrugem asiática.

Trabalhos de genômica funcional do fungo também foram realizados. Uma biblioteca de cDNA unidirecional foi construída utilizando mRNA de uredósporos germinados de *P. pachyrhizi*. Foram identificadas 488 ESTs únicas, 189 das quais apresentaram similaridade significativa com seqüências depositadas na base de dados de proteínas não-redundantes do NCBI ("National Center for Biotechnology Information" - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - POSADA-BUITRAGO & FREDERICK, 2005). A maior parte dos transcritos identificados correspondeu, nesta ordem, a proteínas do metabolismo, expressão gênica, estrutura celular e crescimento, divisão celular, sinalização celular e defesa.

### **3 OBJETIVOS**

No presente trabalho é descrita a utilização de ferramentas da biologia molecular para auxiliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência à ferrugem asiática e para facilitar o melhoramento de cultivares de soja para a resistência durável a este patógeno. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Acessar informações moleculares da soja ao nível do genoma e transcrito, a fim de acelerar a obtenção de variedades resistentes à ferrugem asiática.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar marcadores moleculares ligados aos genes de resistência à ferrugem asiática *Rpp2* e *Rpp4*, possibilitando seu mapeamento nos grupos de ligação da soja.

- Caracterizar as mudanças transcricionais ativadas durante interações compatível e incompatível da planta de soja com o fungo da ferrugem asiática, bem como isolar novas seqüências da soja que respondam ao ataque por este fungo.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA DA NOTÍCIA. **Soja resistente à ferrugem asiática será apresentada a produtores de MT**. Disponível em

<<http://www.agenciadanoticia.com.br/materia.asp?iArt=11375&iType=5>>. Acesso em 13 de março de 2008.

AKOPIAN, A. N.; WOOD, J. Construction and screening of a subtractive cDNA library. In: HUNT, S.; LIVESEY, F. (Ed.). **Functional genomics: a practical approach**. New York: Oxford, 2000. p. 272.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5350-5354, Dec. 1977.

ASSMANN, S. M. G protein regulation of disease resistance during infection of rice with rice blast fungus. **Science**, Washington, v. 2005, n. 310, p. 13-14, Nov. 2005.

AVRDC. Physiological races of soybean rust. **Progress Report 1983**. Shanhua: ROC, 1985. p. 253-257.

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

BAUTZ, E. K.; REILLY, E. Gene-specific messenger RNA: isolation by the deletion method. **Science**, Washington, v. 151, n. 21, p. 328, Jan. 1966.

BAYLES, C. J.; GHEMAWAT, M. S.; AIST, J. R. Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papillae deposition, and resistance to powdery mildew in an *mlo* barley mutant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, n. 1, p. 63-72, Jan. 1990.

BD BIOSCIENCES. **BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual**: Cat. No. 637401. Palo Alto, 2004. Disponível em <<http://www.bdbiosciences.com>>. Acesso em 29 nov. 2005.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-223.

BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.), **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa: Suprema, 2006. 139 p.

BERTRAND, J-P.; LAURENT, C.; LECLERCQ, V. **O mundo da soja**. São Paulo: HUCITEC, 1987. 139 p.

BOWEL G. P.; BINDSCHEDLER, L. V.; BLEE, K. A.; BUTT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1367-1376, May 2002.

BOORSTEIN, W. R.; CRAIG, E.A. Primer extension analysis of RNA. **Methods of Enzymology**, New York, v. 180, p. 347–69, 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Serviço Nacional de Proteção de Cultivares**: certificados de proteção concedidos no período de 01/01/1998 a 07/11/2007. Brasília: MAPA, 2007. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/lst1200\\_07\\_11\\_2007.htm](http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/lst1200_07_11_2007.htm)>. Acesso em: 1º mar. 2007.

BRENNER, S.; JOHNSON, M.; BRIDQHAM, J. GOLDA, G.; LLOYD, D. H.; JOHNSON, D.; LUO, S.; MCCURDY, S.; FOY, M.; EWAN, M.; ROTH, R.; GEORGE, D.; ELETR, S.; ALBRECHT, G.; VERMAAS, E.; WILLIAMS, S. R.; MOON, K.; BURCHAM, T.; PALLAS, M.; DUBRIDGE, R. B.; KIRCHNER, J.; FEARON, K.; MAO, J.; CORCORAN, K. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 6, p. 630-634, June 2000.

BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; VELLO, N. A.; TOLEDO, J. F. F.; PIPOLO, A. E.; CATELLI, L. L.; MARIN, S. R. R. Molecular mapping of a gene conferring resistance to soybean rust In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Abstracts...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 318.

BROMFIELD, K.R. **Soybean rust**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1984. 65 p.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 254-255, Mar.-Apr. 1980.

CALDWELL, P.M. & MACLAREN. Soybean rust research in South Africa. In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Proceedings...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004. p. 354-60.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

CATANZARITI, A.-M.; DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J.; AYLIFFE, M. A.; ELLISA, J. G. Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n.1, p. 243–256, Jan. 2006.

CHENG, Y. W.; CHAN, K. L. The breeding of 'Tainung 3' soybean. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, Taiwan, v. 17, p. 30-35, 1968.

CONAB. **Indicadores da agropecuária**: outubro de 2007. Brasília: CONAB/DIGEM/SUINF/GEINT, Ano XVI, n. 10., 2007. 64 p.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, L.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, Set.-Oct. 1999.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **Estatística genômica**: aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Viçosa: UFV, 2004. p. 568.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos, Versão 9.1. 2006 Disponível em <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>> Acesso 01 dez. 2007.

DALE, J. W.; VON SCHANTZ, M. **From genes to genomes**: concepts and applications of DNA technology. New York: Wiley, 2002. p. 360.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, n. 14, p. 826-833, June 2001.

DEGENHARDT, J.; AL-MASRI, A. N.; OGLU, S. K. R.; SZANKOWSKI, I.; GAU, A. E. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 173, p. 326-335, 2005.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 6025-6030, June 1996.

DONG, X. SA, JA, ethylene, and resistance in plants. **Current Opinion on Plant Biology**, v.1, n. 4, p. 316-323, Aug. 1998.

ELLIS, J.; CATANZARITI, A.-M.; DODDS, P. The problem of how fungal and oomycete avirulence proteins enter plant cells. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 2, p. 61-63, Feb. 2006.

EMBRAPA. **Situação da Ferrugem Asiática da Soja no Brasil e na América do Sul** (Documentos). Londrina: Embrapa Soja, 2004. 30 p.

EMBRAPA. **Tabela de custo ferrugem**. Disponível em <[http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver\\_alerta.php?cod\\_pagina\\_sa=160](http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=160)>. Acesso 5 set. 2007a.

EMBRAPA. **Prejuízo com ferrugem da soja se mantém estável nesta safra**. Disponível em <[http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver\\_alerta.php?cod\\_pagina\\_sa=175&cultura=1](http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=175&cultura=1)> Acessado em 05 de setembro de 2007b.

EMBRAPA. **Diferentes usos do grão**. Disponível em <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=25&cod\\_pai=29](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29)> Acesso 1 dez. 2007c.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**: Special Report 80. Ames: ISU, 1977.

FERNÁNDEZ, C.; GREGORY, W. F.; LOKE, P.; MAIZEL, S. R. M. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide

sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 171-180, Jul. 2002.

FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: Embrapa-Cenargen.

FLOR, H. H. Current status of gene-a-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, Sep. 1971.

FRANCIA, E.; TACCONI, G.; CROSATTI, C.; BARABASCHI, D.; BULGARELLI, D.; DALL'AGLIO, E.; VALE, G. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 317–342, Sep 2005.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, Oct. 1996.

GILLI, J. R.; SEQUIN, L.; SOLDINI, D. O.; MASIERO, B. Estudios de dos regiones del genoma de soja relacionadas con la resistencia genética a la roya asiática. In: Congreso de Soja Del Mercosur, 3., 2006, Rosário. **Resúmenes...** Rosário: ACSOJA, 2006.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 124, n. 1, p. 21-29, Sep 2000.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology**, v. 39, p. 439-446, 1974.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, n. 4, 461-485, Mar. 2005.

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, Bangarole, v.8, p.299-309, 1919.

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

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.1367p.

HASSE, G.; BUENO, F. **O Brasil da soja: abrindo fronteiras, semeando cidades**. Porto Alegre: Ceval Alimentos, 1996. 256 p.

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

HEIN, I.; CAMPBELL, E. I.; WOODHEAD, M.; HEDLEY, P. E.; YOUNG, V.; MORRIS, W. L.; RAMSAY, L.; STOCKHAUS, J.; LYON, G.D.; NEWTON, A. C.; BIRCH, P. R. J. Characterization of early transcriptional changes involving multiple signaling pathways in the Mla13 barley interaction with powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. hordei). **Planta**, Berlin, v. 218, n. 5, p. 803–813, Mar. 2004.

HENNING, A.A.; GODOY, C. V. Situação da ferrugem da soja no Brasil e no mundo. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa MG: Suprema, 2006. 139 p.

HIDAYAT, O. O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v. 1, p. 9-22, 1977.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, 47, p. 837-838, Mar.-Apr. 2007.

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

JOHAL, G. S.; BRIGGS, S. P. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. **Science**, Washington, v. 258, n. 5084, p. 985-987, Nov. 1992.

KATO, M.; YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; YAMAOKA, Y.; ALMEIDA, A. M. R. Epidemiological studies of soybean rust in South America: host susceptibility and pathogenic races. **Jircas Working Report**, Tsukuba, v. 51, p. 35-46, p. 2007.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance Gene Analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 21, p. 11746-11750, Oct. 1996.

KEMEN, E.; KEMEN, A. C.; RAFIQI, M.; HEMPEL, U.; MENDGEN, K.; HAHN, M.; VOEGELE, R. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 18, n. 11, 1130-1130, Nov. 2005.

KIM, Y.-J.; KWAK, C. -I.; GU, Y.-Y.; HWANG, I.-T.; CHUN, J.-Y. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels.

**Biotechniques**, Natick, v. 36, n. 3, p. 424-434, Mar. 2004.

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

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, v. 12, 172-175, 1944.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, J. M.; LINCOLN, S. E.; NEWBERG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, n. 2, p.174-181, Oct. 1987.

LEON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Washington, 108, n. 4, p. 1673-1678, 1995.

LI, H.-Y.; WANG, T.-Y.; SHI, Y.-S.; FU, J.-J.; SONG, Y.-C.; WANG, G.-Y.; LI, Y. Isolation and characterization of induced genes under drought stress at the flowering stage in maize (*Zea mays*). **DNA Sequence**, v. 18, n. 6, p. 445-460, 2007.

LIANG, P.; PARDEE, A. B., Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n. 14, p. 967-971, Aug. 1992.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hipervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, Chicago, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIU, B.H.; KNAPP, S.J. GMENDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, Cary, v. 81, n. 5, p. 407-418, Sep. 1990.

MELTON, D.A.; KRIEG, P. A.; REBAGLIATI, M. R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M. R. Efficient In Vitro Synthesis of Biologically Active RNA and RNA Hybridization Probes From Plasmids Containing a Bacteriophage SP6 Promoter. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 18, p. 7035-7056, Sep. 1984.

MENDGEN, K.; KRIEG, P. A.; REBAGLIATI, M. R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M. R. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 6, p. 1353-1361, Nov. 2006.

MENTABERRY, A. Resistência a hongos fitopatógenos mediante ingeniería genética. 2007. Disponível em <[http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/Clase\\_11\\_Resistencia\\_a\\_hongos.pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/Clase_11_Resistencia_a_hongos.pdf)>. Acesso 01 Dez. 2007.

MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progress** On line, Jan. 2006. doi:10.1094/PHP-2006-0104-01-RS. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/>>. Acesso 20 Dez. 2007.

MICHELMORE, R.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

- MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and Confirmation of the 'Hyyuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, 47, p. 829-834, Mar.-Apr. 2007.
- MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L.. **Soja**: suas aplicações. São Paulo: MEDSI, 1996. 259 p.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p.175-182, Jan. 1993.
- MORTEL, M. V. D.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian Soybean Rust Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sain Paul, v. 20, n. 8, p. 887–899, Aug. 2007.
- MULLER, L. Taxonomia e morfologia. In: MIYASAKA, S; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 65-108.
- NÓRCIO, L. **Grãos de soja resistente à ferrugem asiática devem ser comercializados para a safra de 2010**. Disponível em <<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/09/24/materia.2007-09-24.8411869919/view>>. Acesso em 13 de março de 2008.
- NÜRNBERGER, T., SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 8, p. 372-379, Aug. 2001.
- NUNTAPUNT, M.; SRISOMBUN, S.; CHUNWONGSE, J. Soybean breeding for rust resistance in Thailand and extent of rust resistant cultivars used. In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Abstracts...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 423-430.

PASSIANOTTO, A. L. L.; SILVA, D. C. G.; NOGUEIRA, L. M.; SANTOS, J. V. M.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V.; YAMANAKA, N. Caracterização de dois genes de resistência à ferrugem asiática da soja, *Rpp2* e *Rpp4*, utilizando marcadores moleculares. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 40., 2007, Maringá. **Anais...** Maringá: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007, CD ROM.

PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 320-326, Aug. 2003.

PANTHEE, D. R.; YUAN, J. S.; WRIGHT, D. L.; MAROIS, J. J.; MAILHOT, D.; STEWART, J. R. C.N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 291-301, Oct. 2007.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 417-454.

POLIZEL, A.; BROGIN, R. L.; SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; CATELLI, L. L.; MARIN, S. S. R.; ABDELNOOR, R. V. Mapeamento molecular de um gene de resistência à ferrugem da soja oriundo da cultivar 'FT-2'. In: Congresso Brasileiro de Genética, 51., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p. 465.

POONPOLGUL, S. Country report: how soybean rust is managed in Thailand. In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Proceedings...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004. p. 335-339.

POSADA-BUITRAGO, M. L.; FREDERICK, R. D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 949-962, 2005.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2004. p. 159-161.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasileira, v. 28, n. 2, p. 123-130, Mar.-Abr. 2003.

RISHI, A. S.; MUNIR, S.; KAPUR, V.; NELSON, N. D.; GOYAL, A. Identification and analysis of safener-inducible expressed sequence tags in *Populus* using a cDNA microarray. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 6, p. 296–306, Dez. 2004.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H.-Y.; HUNT, M. D., Systemic Acquired Resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, 1809-1819, Oct. 1996.

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

SCHNEIDER, R. W., HOLIER, C. A.; WHITHAM, H. K.; PLAM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNANDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 774, July 2005.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa MG: UFV, 2004. 568 p.

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, L. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, London, v. 385, n. 6618, p. 718-721, Feb. 1997.

SOARES, R.M. **Identificação prática da ferrugem da soja**. In: South American Workshop on Soybean Rust, 1., 2007, Londrina. Embrapa Soybean: Londrina, 2007.

SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 1, p. 122-128, June 2004.

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

STAUB, J.E, SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.5, p.729-740, 1996.

SUITER, K.A.; WENDELL, J.F.; CASE, J.S. 1983. Linkage 1: a pascal computer-program for the detection and analysis of genetic-linkage. **Journal of Heredity**, Cary, v. 74, n. 3, 203-204, May 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TANKSLEY, S.D.; MILLER, J.; PATERSON, A.; BERNATSKY, R. Molecular mapping of plant chromosomes. In: GUSTAFSON, J.P.; APPELS, R. (Ed.). **Chromosome structure and function: impact of new concepts**. New York: Plenum, 1988. p.157-173.

USDA, 2007. **Oilseeds: world markets and trade**. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2007/November/OILSEEDS%20COVER.pdf>> Acesso 01 Dez. 2007.

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

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, 4407-4414, 1995.

WANG, Y.; CHU, Y.; LIU, G.; WANG, M.-H.; JIANG, J.; HOU, Y.; QU, G.; YANG, C. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 1, p. 78-89, Jan. 2007.

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

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

WINTER, E.; YAMAMOTO, F.; ALMOGNESA, C.; PERUCHO, M. A Method to Detect and Characterize Point Mutations in Transcribed Genes: Amplification and Overexpression of the Mutant c-Ki-ras Allele in Human Tumor Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, n. 22, 7575-7579, Nov. 1985.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 52-56, 2002.

YANG, G. P.; ROSS, D. T.; KANG, W. W.; BROWN, P. O.; WEIGEL, R. J. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1517-1523, Mar. 1999.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 675-677, June 2005.

YORINORI, J.T. O que aprendemos sobre a ferrugem “asiática” da soja, de 2001 a 2006, e como aprimorar o seu controle no Brasil. In: Congresso de Soja Del Mercosur, 3., 2006, Rosário. **Resumenes...** Rosário: ACSOJA., 2006.

YORINORI, J. T.; NUNES JUNIOR, J. **Soybean germplasms with resistance and tolerante to “Asian” rust and screening methods** In: South American Workshop on Soybean Rust, 1., 2007, Londrina. Embrapa Soybean: Londrina, 2007.

ZAMBOLIN, I. Manejo integrado da ferrugem asiática da soja. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Ferrugem asiática da soja**. Viçosa MG: Suprema, 139p, 2006.

ZHENG, J.; ZHAO, J. F.; TAO, Y. Z.; WANG, J. H.; LIU, Y. J.; FU, J. J.; JIN, Y.; GAO, P.; ZHANG, J. P.; BAI, Y. F.; WANG; G. Y. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 6, p.807-823, Aug. 2004.

ZHAO, G.; ABLETT, G. R.; ANDERSON, T. R.; RAJCAN, I.; SCHAAFSMA, A. W. Inheritance and genetic mapping o resistance to rhizoctonia root and hypocotyl rot in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 4, p. 1441-1447, July-Aug. 2005.

ZOUARI, N.; SAAD, R. B.; LEGAVRE, T.; AZAZA, J.; SABAU, X.; JAOUA, M.; MASMOUDI, K.; HASSAIRI, A. Identification and sequencing of ESTs from the halophyte grass *Aeluropus littoralis*. **Gene**, Amsterdam, v. 404, n. 1-2, p. 61–69, Dez. 2007.

## CAPÍTULO 2: MAPEAMENTO MOLECULAR DE DOIS LOCOS QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

### RESUMO

A ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. Esta doença foi identificada no Brasil em 2001 e, rapidamente, infectou campos de soja em vários países da América do Sul. Os principais esforços para combater esta doença devem envolver o desenvolvimento de cultivares resistentes. Quatro genes distintos de resistência à ferrugem asiática foram descritos: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*. Entretanto, não foram disponibilizadas até o momento cultivares resistentes para a produção de grãos. O principal objetivo deste trabalho foi mapear geneticamente os genes de resistência *Rpp2* e *Rpp4*. Duas populações F<sub>2:3</sub> derivadas dos cruzamentos entre os genótipos resistentes PI 230970 (*Rpp2*) e PI 459025 (*Rpp4*) com a cultivar suscetível BRS 184, foram utilizadas neste estudo. As populações de mapeamento e as linhagens parentais foram inoculadas com um isolado do campo de *P. pachyrhizi*, sendo avaliadas quanto ao tipo de lesão como resistentes (lesões RB) ou suscetíveis (lesões tan). As populações de mapeamento foram avaliadas com marcadores SSR, utilizando a análise de segregantes agrupados (BSA) para possibilitar a identificação de marcadores ligados. Ambos os genes de resistência apresentaram a proporção de segregação para um caráter dominante. Este estudo permitiu o mapeamento dos locos *Rpp2* e *Rpp4* nos grupos de ligação J e G, respectivamente, e os marcadores associados terão grande valor no processo de seleção assistida por marcadores para este caráter.

Palavras-chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, SSR

### Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e tem grande potencial para aumentar a produção no futuro devido à existência de áreas não cultivadas e à crescente demanda mundial por produtos de soja. Entre os problemas que afetam a

produção de soja e sua expansão no país, a doença fúngica chamada ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, foi responsável por severos danos econômicos. Até o final do século passado, a ferrugem asiática foi responsável por reduções significativas na produção somente no hemisfério leste, onde as perdas variaram de 5 a 95% (HARTMAN et al., 1991; HARTMAN et al., 1997). Após a primeira identificação da doença no Paraguai e no estado do Paraná, Brasil, em 2001, a ferrugem asiática rapidamente infectou campos de soja por todo o Brasil, Paraguai, Bolívia e algumas regiões da Argentina, causando perdas na produção de até 75% (YORINORI et al., 2005) e tornando esta doença o principal desafio à produção de soja na América Latina. Com a recente detecção de *P. pachyrhizi* nos Estados Unidos (SCHNEIDER et al., 2005), a ferrugem asiática encontra-se presente na maioria das regiões de cultivo de soja do mundo.

O único método disponível atualmente para controlar a ferrugem asiática é a aplicação de fungicidas, os quais aumentam substancialmente o custo de produção e constituem uma fonte contínua de contaminação ambiental. O uso de cultivares resistentes é o método mais promissor para o controle desta doença. Quatro genes distintos de resistência à ferrugem asiática foram reportados: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, e *Rpp4* (CHENG & CHAN, 1968; HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986). Várias outras fontes de resistência também foram identificadas em outros países (MILES et al., 2006) e no Brasil (C.A.A. Arias, comunicação pessoal). Entretanto, não foi lançada qualquer cultivar comercial contendo algum destes genes até o momento.

As reações associadas a esta doença são a presença de lesões castanho avermelhadas (“reddish-brown” ou RB) em genótipos resistentes e a presença de lesões de cor bronze (“tan”) em genótipos suscetíveis. Em alguns casos a resistência também está associada a uma reação imune (sintomas não visíveis), como o gene *Rpp1* na presença de certos isolados (MILES et al., 2006). Todos os locos resistentes avaliados tiveram sua resistência quebrada por pelo menos um isolado em todo o mundo (MILES et al., 2006; YAMAOKA et al., 2002). No entanto, o *Rpp2* e o *Rpp4* permanecem efetivos contra os isolados brasileiros, enquanto a resistência conferida pelo *Rpp1* e

*Rpp3* foi quebrada em 2003, apenas dois anos após a detecção da doença no Brasil. Os locos *Rpp2* e *Rpp4* foram identificados na PI 230970 e na PI 459025, respectivamente, e são herdados como alelos dominantes simples (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986).

A resistência monogênica à ferrugem tem sido um caráter vulnerável em outras espécies. No trigo, a resistência raça-específica à ferrugem é rapidamente quebrada e foi associada a outros tipos de resistência para se obter um resultado mais estável (KOLMER, 1996). Esforços têm sido empregados nos programas de melhoramento para introduzir os locos de resistência à ferrugem em cultivares elite de soja, e a junção de diferentes locos pode resultar em uma resistência à ferrugem mais estável, capaz de controlar a falha histórica de muitos mecanismos monogênicos de resistência a doenças em plantas, especialmente para os genes que levam a uma resposta de hipersensibilidade (NIKS & RUBIALES, 2002). A maior dificuldade neste processo é selecionar plantas carregando mais do que um loco de resistência por métodos convencionais. Técnicas que possam assistir a introgressão de locos múltiplos serão muito úteis.

Os marcadores de DNA têm potencial para assistir à seleção de genótipos nos programas de melhoramento e têm sido utilizados para diversas culturas, incluindo a soja (CONCIBIDO et al., 2004). Esta tecnologia poderá facilitar a busca por uma resistência mais sustentável a *P. pachyrhizi* no futuro. Os microssatélites ou “Simple Sequence Repeats” (SSR) são os principais marcadores atualmente utilizados para mapear a resistência a doenças da soja, devido ao seu alto polimorfismo, codominância, reprodutibilidade e ampla distribuição por todo o genoma. Além disso, mais de mil marcadores SSR bem distribuídos foram mapeados no mapa genético da soja (SONG et al. 2004). O presente estudo descreve o mapeamento dos locos *Rpp2* e *Rpp4* no mapa genético da soja utilizando marcadores SSR.

## Material e Métodos

### Material vegetal

A população de mapeamento do *Rpp2* consistiu de 130 famílias  $F_{2:3}$  derivadas de um cruzamento entre a cultivar brasileira BRS 184, suscetível à ferrugem asiática, e o genótipo PI 230970, homozigota para o alelo de resistência dominante *Rpp2*. Para o loco *Rpp4*, a população de mapeamento consistiu de 80 famílias  $F_{2:3}$ , derivadas do cruzamento entre a mesma linhagem suscetível usada para o mapeamento do *Rpp2* (BRS 184) e o genótipo PI 459025, homozigota para o alelo dominante de resistência *Rpp4*. Cada família  $F_{2:3}$  consistiu de 15 plantas. As linhagens parentais usadas nos cruzamentos foram obtidas do Banco de Germoplasma da Embrapa Soja, localizada em Londrina, PR, Brasil. As duas populações de mapeamento  $F_{2:3}$  e os genitores foram cultivadas em casa de vegetação para a avaliação da resistência à ferrugem e para a coleta de folhas. Os tecidos foliares foram estocados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a extração de DNA.

### Inoculação e Avaliação

O inóculo consistiu de uma população fúngica coletada em campos comerciais no estado do Mato Grosso, e mantido na cultivar BRSMS-Bacuri em condições de casa de vegetação, para a inoculação artificial. Os urediniósporos foram coletados batendo-se as folhas infectadas sobre uma bandeja plástica e diluídos em água destilada com 0,05% (v/v) de "Tween 20" (Uniqema) para uma concentração final de 80.000 esporos/mL. Esta suspensão de esporos foi aplicada sobre plantas no estágio de desenvolvimento V5 (FEHR & CAVINES, 1977). Doze dias após a inoculação, os genitores e as famílias  $F_{2:3}$  foram avaliadas classificando as plantas com lesões castanho-avermelhadas (RB) e baixa esporulação como resistentes, e plantas com lesões de cor bronze ("tan") e alta esporulação, como suscetíveis. As quinze plantas de cada família foram independentemente avaliadas por duas pessoas, e qualquer discrepância no resultado foi resolvida com a avaliação por uma terceira pessoa.

### Extração de DNA e Estratégia de Mapeamento

Amostras de DNA de cada uma das plantas  $F_2$  foram extraídas utilizando o protocolo CTAB modificado (KEIM et al., 1988). Aproximadamente 0,1 g de tecido foliar foi macerado com nitrogênio líquido e misturado ao tampão de extração CTAB (CTAB 1%, NaCl 1,4M, Tris-HCl pH 8,0 0,1M, EDTA 0,5M, Mercaptoetanol 0,1%). Esta mistura foi aquecida, centrifugada, e o sobrenadante foi extraído duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras de DNA foram precipitadas com isopropanol e tratadas com RNase A (1u/ug). A concentração do DNA e sua integridade foram estimados por análise em espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose a 1%, respectivamente.

Os marcadores SSR da soja utilizados neste estudo foram desenvolvidos pelo Centro de Pesquisa Agrícola de Beltsville – BARC/ARS (CREGAN et al., 1999a; SONG et al., 2004). A informação de seqüência dos iniciadores para todos os marcadores SSR utilizados está disponível no site “Soybase” (<http://soybase.agron.iastate.edu/resources/ssr.php>; SOYBASE, 2007). Para garantir uma cobertura suficiente de todo o genoma da soja, pelo menos um marcador polimórfico em cada 20 cM foi utilizado, em cada um dos 20 grupos de ligação da soja. Para encontrar rapidamente marcadores SSR associados aos locos alvo, marcadores conhecidos por sua ligação a locos de resistência a doenças da soja foram primeiramente testados, particularmente nos grupos de ligação A2, F, G e J. Estratégia similar também foi usada para mapear outros locos de resistência na soja (MIAN et al., 1999; GORDON et al., 2006). A estratégia de análise de segregantes agrupados (“Bulked Segregant Analysis” ou BSA; MICHELMORE et al., 1991) foi usada visando possibilitar a busca por marcadores ligados aos genes de resistência à ferrugem asiática. Quatro agrupamentos consistindo de quantidades iguais de DNA de seis plantas foram feitos: dois agrupamentos para o fenótipo resistente e dois para o suscetível. Os agrupamentos foram construídos com base nas avaliações de resistência à ferrugem das famílias  $F_{2,3}$ , permitindo a seleção de somente plantas homocigotas para cada fenótipo diferente. As amostras de DNA dos genitores e dos quatro agrupamentos, para cada cruzamento, foram usadas para a análise de SSR. Para confirmar uma

possível ligação, marcadores polimórficos encontrados entre os agrupamentos contrastantes foram usados para genotipar as populações F<sub>2</sub> completas.

Para a análise de SSR, 30 ng de DNA foram usados como molde em uma reação de 10 µl de volume final contendo tampão (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 32,5 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de Taq DNA polimerase. A ciclagem consistiu de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C, 1 min a 72 °C; seguidos por 7 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% ou agarose-synergel (Diversified Biotech) a 3%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

### Análise dos Dados

Todos os marcadores foram avaliados como codominantes. A reação à ferrugem foi avaliada como um caráter qualitativo codominante, utilizando os resultados da avaliação das progênes F<sub>2:3</sub>. A razão de segregação para os marcadores SSR e os fenótipos observados (reação à ferrugem) foram submetidos ao teste de aderência ao modelo de um gene dominante utilizando o teste do Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ). A análise de ligação e a construção do mapa foram realizadas com o programa QMOL 9.1 (CRUZ & SCHUSTER, 2006) utilizando a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944). O critério de ligação foi um LOD score  $> 3,0$  e uma distância máxima de 37,2 cM.

## Resultados

### Avaliação fenotípica

A reação à ferrugem foi avaliada após a inoculação com um isolado de *P. Pachyrhizi* mantido na cultivar BRSMS-Bacuri. Esta cultivar é conhecida por sua alta suscetibilidade ao isolado de ferrugem usado neste estudo. Esta cultivar, entretanto, foi resistente ao primeiro isolado identificado no Brasil em 2001. O mesmo isolado do campo que quebrou a resistência dos locos *Rpp1* e *Rpp3*, levou à quebra da resistência desta cultivar. A manutenção do inóculo nesta cultivar garantiu o uso do isolado presente atualmente na maioria das áreas brasileiras de cultivo de soja. Os genitores PI

230970 (*Rpp2*) e PI 459025 (*Rpp4*) apresentaram reações típicas de resistência, enquanto a BRS 184 apresentou a reação esperada de suscetibilidade à ferrugem asiática. Para as populações de mapeamento do *Rpp2* e *Rpp4*, uma progênie de 15 plantas foi avaliada por família  $F_{2:3}$ , possibilitando a avaliação da resistência à ferrugem como um caráter qualitativo. Ambos os genes se enquadraram satisfatoriamente na razão esperada para a segregação de um único gene dominante (Tabela 1). Vinte e cinco das 130 famílias  $F_{2:3}$ , avaliadas na população de mapeamento do *Rpp2*, foram homocigotas resistentes, 77 foram heterocigotas resistentes e 28 foram homocigotas suscetíveis. Para a população de mapeamento do *Rpp4*, 29 famílias foram homocigotas resistentes, 32 foram heterocigotas resistentes e 19 foram homocigotas suscetíveis nas 80 famílias  $F_{2:3}$  avaliadas.

#### Amplificação de SSR e Análise de Ligação

Na população de mapeamento do *Rpp2*, um total de 177 marcadores SSR foram amplificados e 77 foram polimórficos entre os genitores PI 230970 e BRS 184, enquanto para a população de mapeamento do *Rpp4*, 65 de 175 marcadores SSR foram polimórficos entre as linhagens parentais PI 459025 e BRS 184. Os quatro agrupamentos de DNA de cada população foram inicialmente amplificados com os marcadores polimórficos. Dois marcadores, Satt431 e Satt406, do grupo de ligação J, foram polimórficos entre os pares de agrupamentos para o mapeamento do *Rpp2*. Para o mapeamento do *Rpp4*, três marcadores SSR foram polimórficos entre os agrupamentos resistente e suscetível, entretanto, somente dois deles, o Satt199 e o Satt288, estavam realmente ligados ao *Rpp4* no grupo de ligação G. Uma vez que a ligação destes marcadores aos respectivos genes foi confirmada através da amplificação dos mesmos na população de mapeamento completa, outros marcadores SSR para os grupos de ligação G e J foram escolhidos com base nas informações disponíveis do mapa genético integrado da soja (SONG et al., 2004). Todos os marcadores SSR mapeados neste trabalho se enquadraram satisfatoriamente à razão esperada para uma herança co-dominante (1:2:1) nas populações de mapeamento do *Rpp2* e *Rpp4* (Tabela 1). O programa GQMOL 9.1 mapeou o *Rpp2* a 7,3 cM do Sat\_255 e 5,6 cM do Satt620,

no grupo de ligação J, enquanto o *Rpp4* foi mapeado a 1,9 cM do Satt288 e 12,8 cM do AF162283, no grupo de ligação G (Figura 1).

Tabela 1. Análise de qui-quadrado da segregação fenotípica quanto à resistência à ferrugem asiática da soja (geração F<sub>2:3</sub>) e marcadores SSR (geração F<sub>2</sub>) nas populações de mapeamento do *Rpp2* e do *Rpp4*.

Marcador/caráter	Proporção observada*			Proporção esperada*			$\chi^{2**}$	Probabilidade %
	A	B	C	A	B	C		
<b>População de mapeamento do <i>Rpp2</i> (Grupo de ligação J)</b>								
Reação à ferrugem	25	77	28	32,5	65	32,5	4,57 <sup>ns</sup>	10,18
Satt406	28	73	29	32,5	65	32,5	1,99 <sup>ns</sup>	37,07
Satt280	28	72	30	32,5	65	32,5	1,57 <sup>ns</sup>	45,63
Satt596	28	73	29	32,5	65	32,5	1,99 <sup>ns</sup>	37,07
Satt456	29	71	30	32,5	65	32,5	1,12 <sup>ns</sup>	57,03
Satt529	28	72	30	32,5	65	32,5	1,57 <sup>ns</sup>	45,63
Sat_255	28	69	33	32,5	65	32,5	0,88 <sup>ns</sup>	64,50
Sct_001	28	70	32	32,5	65	32,5	1,02 <sup>ns</sup>	60,19
Sat_093	29	69	32	32,5	65	32,5	0,63 <sup>ns</sup>	72,95
Sat_366	28	71	31	32,5	65	32,5	1,25 <sup>ns</sup>	53,63
Satt620	28	71	31	32,5	65	32,5	1,25 <sup>ns</sup>	53,63
Satt547	27	62	41	32,5	65	32,5	3,29 <sup>ns</sup>	19,28
Satt431	29	58	43	32,5	65	32,5	4,52 <sup>ns</sup>	10,42
<b>População de mapeamento do <i>Rpp4</i> (Grupo de ligação G)</b>								
Reação à ferrugem	29	32	19	20	40	20	5,70 <sup>ns</sup>	5,78
Satt199	22	43	15	20	40	20	1,68 <sup>ns</sup>	43,28
Satt012	21	47	12	20	40	20	4,48 <sup>ns</sup>	10,67
Satt503	21	47	12	20	40	20	4,48 <sup>ns</sup>	10,67
Satt517	22	47	11	20	40	20	5,48 <sup>ns</sup>	6,47
Satt288	28	34	18	20	40	20	4,30 <sup>ns</sup>	11,65
AF162283	26	36	18	20	40	20	2,40 <sup>ns</sup>	30,12
Satt191	29	36	15	20	40	20	5,70 <sup>ns</sup>	5,78

\*A, B e C significam: genótipo homocigoto equivalente ao da linhagem parental resistente, genótipo heterocigoto e genótipo homocigoto equivalente ao da linhagem parental suscetível, respectivamente.

\*\*ns significa: não significativo ao nível de significância de 5% e 2 graus de liberdade.

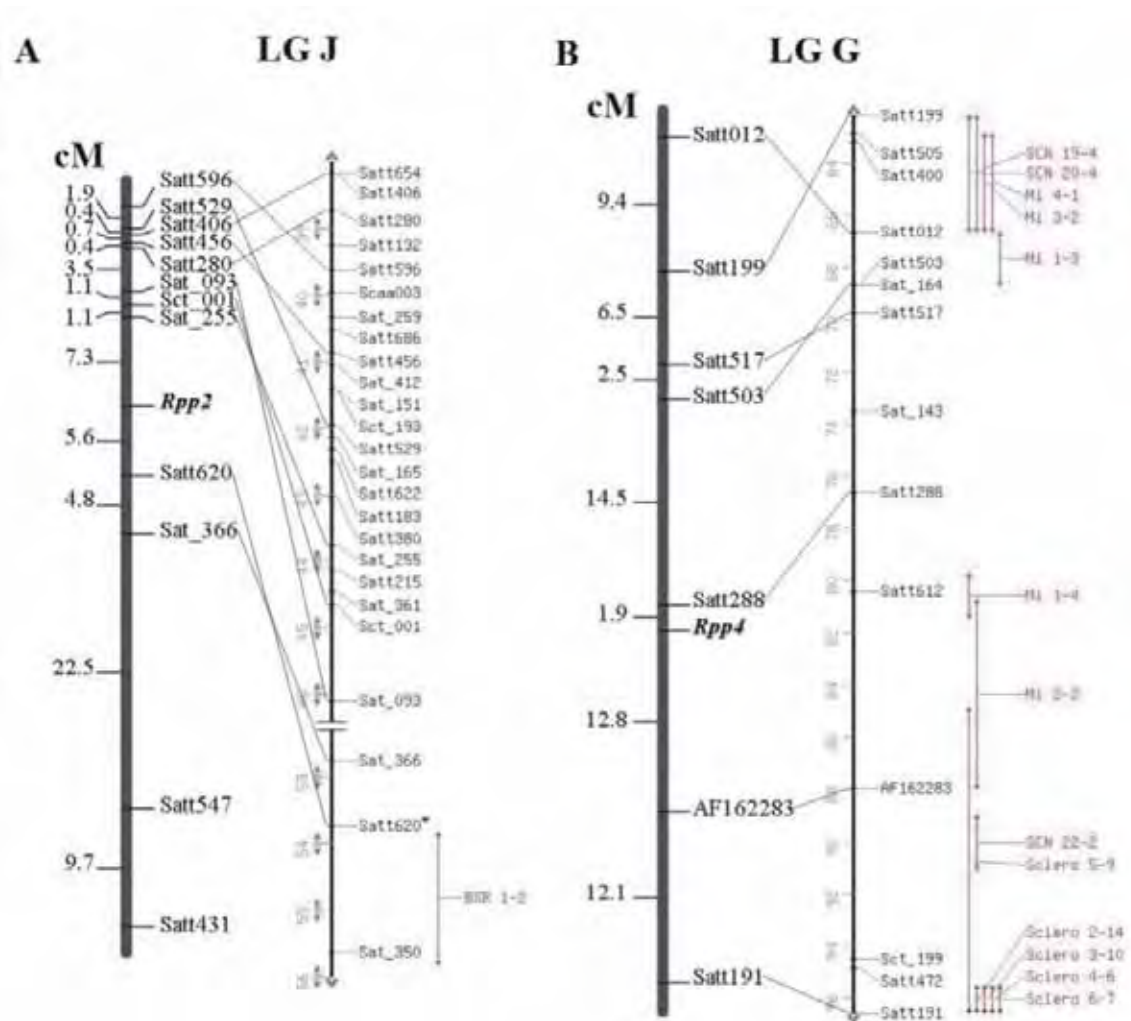


Figura 1. Mapas de ligação das regiões genômicas do *Rpp2* (A) e *Rpp4* (B). No lado esquerdo de cada figura (A e B) é mostrado o mapa genético gerado neste estudo e no lado direito é mostrada parte dos grupos de ligação consenso J (A) e G (B), mostrando os marcadores mapeados na região com distâncias cumulativas em cM. No lado direito do grupo de ligação consenso são mostrados QTLs para locos de resistência mapeados nesta região (BSR - “Brown Stem Rot” ou podridão parda; Mi - *M. incognita*; SCN - “Soybean Cist Nematode” ou Nematóide do Cisto; Sclero - *Sclerotinia*). Estas porções do mapa de ligação consenso foram gerados na página da web do Soybase (mapa físico da cultivar Williams; SOYBASE, 2007). \* O marcador Satt620 não estava presente no mapa físico da Williams, mas sua posição foi inferida com base no mapa genético composto da soja (SONG et al., 2004), disponível em <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/1190/soymap2.mht>.

## Discussão

A resistência à ferrugem asiática da soja é uma importante característica na maioria dos programas de melhoramento de soja por todo o mundo. Entretanto, nenhuma cultivar resistente foi lançada até o momento. Dos quatro locos de resistência previamente identificados no genoma da soja, dois foram mapeados neste estudo: *Rpp2* e *Rpp4*. Este estudo revelou que o *Rpp2* e o *Rpp4* estão localizados nos grupos de ligação J e G, respectivamente. Estes locos de resistência são conhecidos há mais de 30 anos, mas somente com o recente surgimento da ferrugem asiática da soja na América do Sul eles se tornaram foco de estudos moleculares mais intensos. Esforços anteriores na Tailândia também localizaram um loco de resistência no grupo de ligação G, em uma associação estreita com os marcadores Satt012 and Satt472 (NUNTAPUNT et al., 2004). Entretanto, não se sabe se a fonte de resistência foi gerada por mutagênese nem se este gene é alélico ao *Rpp4*. Vários outros locos de resistência estão sendo estudados. Recentemente, um loco de resistência encontrado na cultivar brasileira 'FT-2' foi mapeado no grupo de ligação C2 (BROGIN et al., 2004, POLIZEL et al., 2006). Coincidentemente, um loco de resistência encontrado na cultivar japonesa 'Hyuuga' foi mapeado na mesma localização genômica, entre os marcadores SSR Satt460 e Satt307 (MONTEROS et al., 2007). Novamente, não se sabe se estes dois locos são alelos do mesmo gene ou genes de resistência independentes. Entretanto, enquanto a 'Hyuuga' permanece resistente ao isolado utilizado neste estudo (MONTEROS et al., 2007), a resistência da 'FT-2' foi quebrada. Recentemente, o loco *Rpp1* foi mapeado na porção inferior do grupo de ligação G (HYTEN et al., 2007), mas, diferentemente de outros locos de resistência, o *Rpp1* confere uma resposta imune ao isolado de ferrugem India-73-1, usado no experimento de mapeamento.

Uma vez que ainda não há estudos sobre as raças da ferrugem no Brasil e, devido ao fato de o *Rpp2* e o *Rpp4* conferirem resistência à maioria dos isolados caracterizados em outros países (YAMAOKA et al., 2002), este estudo foi realizado com um isolado do campo, mantido na cultivar BRSMS-Bacuri em casa de vegetação. Não houve diferença de severidade da doença entre as duas fontes de resistência usadas neste estudo. Ambos os locos de resistência se enquadraram nos padrões esperados,

apresentando reações de resistência típicas (lesões “RB”). O *Rpp2* e o *Rpp4* também se comportaram como caracteres dominantes, confirmando os estudos genéticos prévios nestes dois locos (HARTWIG, 1986; HARTWIG & BROMFIELD, 1983).

Ambos os locos de resistência, *Rpp2* e *Rpp4*, estão localizados em regiões consideradas ‘pontos quentes’ para genes de resistência, o que significa que a estratégia de utilizar marcadores previamente conhecidos como ligados a outros locos de resistência teve sucesso. Entre os marcadores escolhidos para fazer a busca inicial, baseado na informação dos locos de resistência mapeados, o Satt431, ligado ao loco *Rbs1* (podridão parda; BACHMAN et al., 2001) no grupo de ligação J, e o Satt199, ligado ao loco de característica quantitativa (“QTL”) para a podridão da haste (*Sclerotinia* sp; ARAHANA et al. 2001) e também para o nematóide da galha *Meloidogyne incognita* (LI et al., 2001), no grupo de ligação G, foram polimórficos entre os “bulks” resistentes e suscetíveis.

A região cromossômica vizinha ao *Rpp4* contém um agrupamento de genes de resistência. QTLs significativos para resistência a várias doenças foram descobertos nesta região. Dentro do intervalo de 20 cM contendo o loco *Rpp4*, são encontrados QTLs para resistência ao nematóide da galha (*M. incognita*; LI et al., 1991; TAMULONIS et al., 1997), podridão branca (ARAHANA et al., 2001), e o nematóide do cisto *M. javanica* (YUE et al., 2001; WANG et al., 2001; Fig. 1B). Em adição, os genes de resistência *rhg1* (nematóide do cisto; CONCIBIDO et al., 1994; CREGAN et al., 1999b), *Rps4*, *Rps5*, *Rps6* (podridão da raiz causada por *Phytophthora*; DEMIRBAS et al., 2001), *Rfs* (síndrome da morte súbita; CHANG et al., 1997) e o recentemente mapeado *Rpp1* (HYTEN et al., 2007) estão também localizados neste grupo de ligação.

O grupo de ligação J também é conhecido por conter agrupamentos de genes de resistência, estando a maioria dos locos de resistência localizados na porção inferior do grupo. Os locos *Rps2* (de resistência à podridão da raiz causada por *Phytophthora*), *Rmd* (de resistência ao oídio) e *Rj2* (controle da nodulação por *Bradyrhizobium japonicum*) foram todos localizados dentro de um intervalo de 3,8 cM na base deste grupo de ligação (POLZIN et al., 1994). O loco *Rpp2* foi mapeado a cerca de 25 cM deste agrupamento de genes de resistência. Adicionalmente, os locos de resistência

*Rbs1* e *Rbs3* (podridão marrom da haste; BACHMAN et al., 2001; PATZOLDT et al., 2005) e *Rcs3* (Mancha olho-de-rã; MIAN et al., 1999) se localizam próximos a esta região, além de um QTL para resistência ao nematóide do cisto recentemente identificado (GUO et al., 2005). Em adição a estes locos de resistência, vários análogos de genes de resistência (“Resistance Genes Analogs” ou RGAs) também foram mapeados nesta região (KANAZIN et al., 1996; GRAHAM et al., 2002). “Clusters” de resistência não são raros e já foram reportados para várias espécies de plantas (MICHELMORE & MEYERS, 1998).

Os mapas de ligação gerados por este estudo indicaram que a ordem dos marcadores moleculares foi consistente com o mapa de ligação consenso da soja (SONG et al., 2004) com poucas inversões e pequenas diferenças em distância (Figura 1). Diferenças nas posições de locos são esperadas uma vez que as análises de ligação foram realizadas com diferentes populações de mapeamento. Estes mapas podem ser úteis na seleção de marcadores adequados para a seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento visando resistência a este patógeno. Embora alguns dos marcadores mapeados nestas populações não estejam estreitamente ligados aos locos de resistência, outros marcadores localizados na mesma região podem ser úteis em germoplasmas diferentes. O loco *Rpp4* foi mapeado entre o Satt288 e o AF162283. Outros dois marcadores, Sat\_143 e Satt612, os quais flanqueiam o Satt288 (Figura 1B), não foram polimórficos na população utilizada neste estudo. Situação similar ocorreu no loco *Rpp2*. Vários marcadores, mapeados em um intervalo de 2 cM, se localizaram a 7,3 cM acima do loco *Rpp2* (Figura 1A). Três marcadores adicionais nesta região, Satt215, Sat\_361 e Satt621 (não apresentado no mapa consenso da Figura 1), não foram polimórficos nesta população e poderiam, talvez, revelar uma associação mais próxima ao *Rpp2*. Nenhum marcador BARC\_SSR adicional está disponível no intervalo entre o Sat\_093/Sat\_255/Sct\_001 e o Satt620. Entretanto, para obter um mapa saturado desta região, esforços de mapeamento adicionais envolvendo diferentes populações e outros tipos de marcadores moleculares são necessários. Atualmente, novos marcadores SSR baseados no seqüenciamento de extremidades de bibliotecas BAC (“Bacterial Artificial Chromosome” ou Cromossomo Artificial Bacteriano) estão

sendo desenvolvidos pela Universidade do Sul de Illinois (SCHULTZ et al., 2006) e um mapa de SNPs da soja está sendo desenvolvido (SPECHT et al., 2006). Estes novos marcadores podem ser úteis para aumentar a densidade de marcadores nestas regiões. De qualquer forma, os marcadores SSR ligados ao *Rpp2* e *Rpp4* descritos neste trabalho serão de grande utilidade para assistir a introgressão de múltiplos locos em uma única cultivar e terão grande valor como um ponto de início em direção à clonagem destes genes de resistência.

### Referências Bibliográficas

ARAHANA, V. S.; GRAEF, G. L.; SPECHT, J. E.; STEADMAN, J. R.; ESKRIDGE, K. M. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 1, p. 180-188, Jan.-Feb. 2001.

BACHMAN, M. S.; TAMULONIS, J. P.; NICKELL, C. D.; BENT, A. F. Molecular markers linked to brown stem rot resistance genes, *Rbs(1)* and *Rbs(2)*, in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 2, p. 527-535, Mar.-Apr. 2001.

BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; VELLO, N. A.; TOLEDO, J. F. F.; PIPOLO, A. E.; CATELLI, L. L.; MARIN, S. R. R. Molecular mapping of a gene conferring resistance to soybean rust In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Abstracts...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 318.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 254-255, Mar.-Apr. 1980.

CHENG, Y. W.; CHAN, K. L. The breeding of 'Tainung 3' soybean. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, Taiwan, v. 17, p. 30-35, 1968.

CHANG, S. J. C.; DOUBLER, T. W.; KILO, V. Y.; ABUTHREDEIH, J.; PRABHU, R.; FREIRE, V.; SUTTNER, R.; KLEIN, J.; SCHMIDT, M. E.; GIBSON, P. T., LIGHTFOOT,

D. A. Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) Race 3. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 965-971, 1997.

CONCIBIDO, V. C.; DIERS, B. W.; ARELLI, P. R. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 4, p. 1121-1131, Jul.-Aug. 2004.

CONCIBIDO, V. C.; DENNY, R. L.; BOUTIN, S. R.; HAUTEA, R.; ORF, J. H.; YOUNG, N. D. DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst-nematode (*Heterodera glycines* ichinohe). **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 240-246, 1994.

CREGAN, P. B.; JARVIK, T.; BUSH, A. L.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; KAHLER, A. L.; KAYA, N.; VANTOAI, T. T.; LOHNES, D. G.; CHUNG, L.; SPECHT, J. E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1464-1490, Set.-Oct. 1999.

CREGAN, P. B.; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; MAREK, L. F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R. C.; MATTHEWS, B. F.; JARVIK, T.; YOUNG, N. D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, n. 6-7, 919-928, May 1999b.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 9.1., 2006. Disponível em <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>> Acesso 2 Abr. 2007.

DEMIRBAS, A.; RECTOR, B. G.; LOHNES, D. G.; FIORITTO, R. J.; GRAEF, G. L.; CREGAN, P. B.; SHOEMAKER, R. C.; SPECHT, J. E. Simple sequence repeat markers linked to the soybean rps genes for phytophthora resistance. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1220-1227, July-Aug. 2001.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**: Special Report 80. Ames: ISU, 1977.

GORDON, S. G.; MARTIN, S. K. S.; DORRANCE; A. E. *Rps8* maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 1, p.168-173, Jan.-Feb. 2006.

GRAHAM, M. A.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Organization, expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean. **Genetics**, Baltimore, v. 162, n. 4, p. 1961-1977, Dec. 2002.

GUO, B.; SLEPER, D. A.; ARELLI, P. R.; SHANNON, J. G.; NGUYEN, H. T. Identification of Qtls associated with resistance to soybean cyst nematode races 2, 3 and 5 in soybean PI 90763. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 111, n. 5, p. 965-971, Sep. 2005.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; TSCHANZ, A. T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 596-600, June 1991.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean Rust Research: progress and future prospects. In: World Soybean Research Conference, 5., 1997, Kasetsart. **Proceedings...** Kasetsart, 1997. p. 180-186.

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

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

HIDAYAT, O. O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v. 1, p. 9-22, 1977.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, 47, p. 837-838, Mar.-Apr. 2007.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance Gene Analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 21, p. 11746-11750, Oct. 1996.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v. 15, p. 150-152, 1988.

KOLMER, J. A. Genetics of Resistance to Wheat Leaf Rust. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 435-455, Sep. 1996.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, v. 12, 172-175, 1944.

LI, Z.; JAKKULA, L.; HUSSEY, R. S.; TAMULONIS, J. P.; BOERMA, H. R. SSR Mapping and confirmation of the qtl from PI 96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, n. 6, p. 1167-1173, Oct. 2001.

MIAN, M. A. R.; WANG, T. Y.; PHILLIPS, D. V.; ALVERNANZ, J.; BOERMAN, H. R. Molecular mapping of the *Rcs3* gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 6, p.1687-1691, Nov.-Dez. 1999.

MICHELMORE, R.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9828-9832, Nov. 1991.

MICHELMORE, R. W.; MEYERS, B. C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Research**, v. 8, p. 1113-1130, Nov. 1998

MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progress** On line, Jan. 2006. doi:10.1094/PHP-2006-0104-01-RS. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/>>. Acesso 20 Dez. 2007.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and Confirmation of the 'Hyyuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, 47, p. 829-834, Mar.-Apr. 2007.

NIKS, R. E.; RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 201-216, Mar. 2002.

NUNTAPUNT, M.; SRISOMBUN, S.; CHUNWONGSE, J. Soybean breeding for rust resistance in Thailand and extent of rust resistant cultivars used. In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Abstracts...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 423-430.

PATZOLDT, M. E.; GRAU, C. R.; STEPHENS, P. A.; KURTZWEIL, N. C.; CARLSON, S. R.; DIERS, B. W. Localization of a quantitative trait locus providing brown stem rot

resistance in the soybean cultivar Bell. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 4, p. 1241-1248, July-Aug. 2005.

POLZIN, K. M.; LOHNES, D. G.; NICKELL, C. D.; SHOEMAKER, R. C. Integration of *Rps2*, *Rmd*, and *Rj2* into linkage group-J of the soybean molecular map. **Journal of Heredity**, Cary, v. 85, n. 4, p. 300-303, July 1994.

SCHNEIDER, R. W., HOLIER, C. A.; WHITHAM, H. K.; PLAM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNANDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 774, July 2005.

SHULTZ, J. L.; KURUNAM, D.; SHOPINSKI, K.; IQBAL, M. J.; KAZI, S.; ZOBRIST, K.; BASHIR, R.; YAEGASHI, S.; LAVU, N.; AFZAL, A. J.; YESUDAS, C. R.; KASSEM, M. A.; WU, C. C.; ZHANG, H. B.; TOWN, C. D.; MEKSEM, K.; LIGHTFOOT, D. A. The soybean genome database (SoyGd): a browser for display of duplicated, polyploid, regions and sequence tagged sites on the integrated physical and genetic maps of *Glycine max*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, supplement 1, p. 758-765, Jan. 2006.

SPECHT, J.; CHOI, I. Y.; HYTEN, D.; CHASE, K.; GORDON, L. K.; CREGAN, P. The soybean SNP map - an update. In: ASA-CSSA-SSSA International Meetings, 1., Indianapolis, 2006. **Abstracts...** Indianapolis: ASA-CSSA-SSSA, 2006.

SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V. C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 1, p. 122-128, June 2004.

SOYBASE. **Soybase and the soybean breeder's toolbox**. Ames, IA. Disponível em <<http://soybase.org/>>. Acesso 5 Mar. 2007.

TAMULONIS, J. P.; , LUZZI, B. M.; HUSSEY, R. S.; PARROTT, W. A.; BOERMA, H. R. DNA markers associated with resistance to javanese root-knot nematode in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 783-788, 1997.

WANG, D.; ARELLI, P. R.; SHOEMAKER, R. C.; DIERS, B. W. Loci underlying resistance to race 3 of soybean cyst nematode in Glycine soja plant introduction 468916. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, n. 4, p. 561-566, Sep. 2001.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 52-56, 2002.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES, J. J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 675-677, June 2005.

YUE, P.; ARELLI, P. R.; SLEPER, D. A. Molecular characterization of resistance to Heterodera glycines in soybean PI 438489b. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, n. 6-7, p. 921-928, May 2001.

## CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE GENES DA SOJA INDUZIDOS DURANTE INTERAÇÃO COM A FERRUGEM ASIÁTICA

### RESUMO

O presente trabalho identifica genes da soja ativados durante interações compatível e incompatível entre soja e ferrugem, mediante a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA. Quatro bibliotecas subtrativas foram geradas pela metodologia SSH, usando os seguintes tratamentos: folhas do genótipo resistente PI 230970 (que possui o alelo de resistência *Rpp2*), e do genótipo suscetível Embrapa 48, coletadas às 24 e 192 horas após a inoculação com esporos do fungo. 3.807 seqüências viáveis foram produzidas no conjunto das quatro bibliotecas, das quais 670 foram seqüências únicas, resultando num índice de redundância de 82,4%. A categoria funcional mais representada nas bibliotecas foi “proteção celular, defesa e virulência”. O conjunto de seqüências únicas foi impresso em microarranjos sobre lâminas de vidro e hibridizado com cDNAs-alvo representando as mesmas condições aplicadas para a construção das bibliotecas. Apenas 65 transcritos foram diferencialmente expressos, estando eles envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e proteínas antimicrobianas, morte celular e senescência, modificação, estabilização e degradação protéica, controle da expressão gênica e reforço de parede celular. Os resultados deste trabalho contribuíram para a elucidação da interação molecular entre soja e ferrugem asiática e poderão auxiliar no desenvolvimento de métodos mais eficientes de controle do fungo.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, microarranjos de cDNA, *Phakopsora pachyrhizi*, respostas de defesa, SSH

### Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes do mundo, devido à crescente demanda mundial por alimentos e às novas aplicações do grão nas indústrias de biocombustíveis e bioprodutos. O Brasil, atrás dos Estados Unidos, é o segundo maior produtor mundial, produzindo 58,4 milhões de toneladas na safra de

2006/2007 (CONAB, 2007). A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow, foi primeiramente encontrada no Brasil em 2001 e, desde então, tem causado perdas significativas à produção de soja. Esta doença é atualmente a maior ameaça à competitividade da soja brasileira e uma ameaça potencial aos Estados Unidos, onde ela tem sido encontrada desde novembro de 2004 (SCHNEIDER et al., 2005).

Foram identificados quatro genes de resistência (*R*) à ferrugem asiática, dominantes e independentes, denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* (CHENG & CHAN, 1968; HIDAYAT & SOMAATMADJA, 1977; BROMFIELD & HARTWIG, 1980; HARTWIG, 1986). Além destes, foram identificados locos de resistência em vários outros genótipos (MILES et al., 2006), para os quais, entretanto, não foi comprovada a relação de alelismo com os genes previamente identificados. No momento em que a ferrugem asiática chegou ao Brasil, os quatro genes de resistência eram efetivos em proteger a soja contra a doença. Entretanto, a partir de 2004, uma nova raça de *P. pachyrhizi* passou a ser predominante no Brasil e levou à quebra da resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3*. Assim, dos quatro genes destacados previamente, somente os genes *Rpp2* e *Rpp4* ainda conferem resistência à ferrugem asiática no Brasil.

Alguns dos locos de resistência foram mapeados nos grupos de ligação da soja, como o *Rpp1* (HYTEN et al., 2007), o loco presente na cultivar japonesa Hyuuga (MONTEROS et al., 2007) e o *Rpp2* e *Rpp4* (Capítulo 2). Apesar da importância destes genes, nenhum deles foi clonado até o momento. Além disso, não existem cultivares de soja resistentes disponíveis para a produção de grãos no Brasil (BRASIL, 2007) ou nos EUA (SCHNEIDER et al., 2006).

A resistência monogênica raça-específica, como a conferida pelos genes *Rpp*, é frequentemente explicada pela teoria gene-a-gene. O reconhecimento do patógeno resulta da interação direta do produto de um gene *R*, geralmente dominante, com o produto do gene *Avr* correspondente do patógeno (FLOR, 1971). Uma vez reconhecido o patógeno, a planta imediatamente responde mediante a indução de defesa no ambiente extracelular (apoplasto) para inibição de enzimas microbianas, reforço da

parede celular ou intoxicação do patógeno. Como um segundo nível de defesa, a reação de hipersensibilidade (“Hipersensitive Reaction” ou HR), caracterizada por morte celular no local da infecção, restringe o patógeno ao pequeno espaço apoplástico. Neste local, uma forte reação de defesa, que é caracterizada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (“Reactive Oxygen Species” ou ROS), proteínas antimicrobianas e fitoalexinas, ataca ambos o invasor e a célula invadida, culminando no suicídio celular local, o qual barra o patógeno biotrófico de um crescimento posterior (HÜCKELHOVEN, 2007). As respostas locais no ponto de infecção também desencadeiam uma resistência subsequente não específica que ocorre por toda a planta. Este fenômeno, chamado resistência sistêmica adquirida (“Systemic Acquired Resistance” ou SAR), é de longa duração e efetivo contra um amplo espectro de patógenos. Ele é correlacionado com a indução de genes de resposta de defesa nas folhas não infectadas, o que protege os novos tecidos de infecções secundárias (RYALS et al., 1996).

A base molecular da interação entre plantas e patógenos fúngicos é bem conhecida para vários patossistemas, como o arroz (*Oryza sativa*) e a brusone do arroz (*Magnaporthe grisea*; EBBOLE, 2007), o tomate (*Lycopersicum esculentum*) e a mancha-de-cladospório (*Cladosporium fulvum*; RIVAS & THOMAS, 2005), o linho (*Linum usitatissimum*) e a ferrugem do linho (*Melampsora lini*; ELLIS et al., 2007), a fava (*Vicia faba*) e a ferrugem da fava (*Uromyces fabae*; VOEGELE, 2006), entre outros. Estudos microscópicos descreveram detalhadamente a infecção e o desenvolvimento da ferrugem asiática em genótipos de soja resistentes e suscetíveis (MCLEAN, 1979; BONDE & BROWN, 1980; MCLEAN & BITH, 1981). Entretanto, pouco se sabe sobre a interação molecular entre soja e ferrugem asiática, e sobre as alterações metabólicas desencadeadas por essa interação.

Em trabalho anterior, MENDGEN et al. (2006) investigaram sinais metabólicos induzidos em plantas para o estabelecimento da biotrofia de fungos patogênicos. Eles demonstraram a emissão de quatro diferentes compostos voláteis em plantas de fava atacadas com a ferrugem *U. fabae*. Três destes compostos, o nonanal, o decanal e o acetato de hexenil, promoveram a diferenciação de haustórios, estruturas de nutrição do fungo, em micélios de *U. fabae* desenvolvendo-se sobre membranas artificiais. Em

contraste, o quarto composto, o terpenóide acetato de farnesil, não só suprimiu esta diferenciação como foi capaz de controlar o desenvolvimento de várias espécies de ferrugens testadas em seus hospedeiros naturais, incluindo a ferrugem asiática da soja, para a qual a eficiência do controle foi de 98%. Estes resultados são importantes para a compreensão de possíveis rotas metabólicas ativadas em plantas de soja resistentes e suscetíveis sob o ataque da ferrugem asiática.

Em trabalhos recentes, MORTEL et al. (2007) e PANTHEE et al. (2007) realizaram experimentos independentes para determinar os efeitos da infecção com ferrugem asiática na expressão de RNAs mensageiros da soja através da análise do “GeneChip Soybean Genome Array”. Em ambos os trabalhos foram detectadas mudanças transcricionais frequentemente relacionadas à resposta de plantas a fitopatógenos. Entretanto, até o momento, não foram publicados trabalhos relatando a clonagem de genes envolvidos na resposta de defesa à ferrugem asiática. Assim, deve haver transcritos de defesa responsivos à infecção com *P. pachyrhizi* nos genótipos resistentes que ainda não são conhecidos. A clonagem destes transcritos possibilitará no futuro o desenvolvimento de estudos funcionais dos mesmos, representando um avanço no conhecimento da interação molecular entre soja e ferrugem. O objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente genes ativados em interações compatíveis e incompatíveis entre soja e ferrugem asiática, mediante a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA de folhas de soja infectadas.

## **Material e Métodos**

### **Inoculação e Delineamento Experimental**

O desenvolvimento das populações vegetais e do inóculo, os tratamentos, e a primeira etapa do processo de isolamento de RNA foram realizados na Embrapa Soja, Londrina, Brasil. Uma população de *P. pachyrhizi* foi coletada em campos experimentais no Estado do Mato Grosso, Brasil, e multiplicada por cinco gerações na cultivar brasileira suscetível BRSMS-Bacuri em uma casa de vegetação isolada, para a inoculação artificial. A população vegetal de multiplicação do inóculo se desenvolveu sob uma temperatura diurna de 28 a 30 °C e uma temperatura noturna de 22 a 25 °C,

80% de umidade relativa  $\pm$  5% e 12 h de luz. A população fúngica utilizada é altamente similar a um isolado do Zimbábue, de acordo com a amplificação e seqüenciamento da região ITS do fungo (R. V. Abdelnoor, comunicação pessoal). Os urediniósporos foram coletados batendo-se folhas infectadas sobre uma bandeja plástica e foram misturados em água destilada com 0,05% de Tween 20 (v/v) para uma concentração final de 130.000 esporos  $\text{ml}^{-1}$ . Esta suspensão de esporos foi pulverizada sobre plantas no estágio de desenvolvimento  $V_2$  (FEHR & CAVINESS, 1977). A mesma solução sem esporos foi usada para o tratamento de um grupo controle, composto por uma repetição do mesmo material vegetal, em mesmo estágio de desenvolvimento, submetido a falsas inoculações.

Foram utilizados neste estudo o genótipo de soja PI 230970, homocigoto para o alelo de resistência à ferrugem asiática *Rpp2*, e a cultivar brasileira suscetível Embrapa 48. Estes genótipos produzem as lesões características de resistência (marrom-avermelhadas; “reddish-brown” ou RB) e de suscetibilidade (bronzeadas; “tan”), respectivamente. Os tratamentos foram conduzidos em câmaras de crescimento, sob uma temperatura diurna de 25 a 28° C e uma temperatura noturna de 20 a 22 °C, 90% de umidade relativa  $\pm$  2% e 12 h de luz. Após a inoculação, as plantas permaneceram cobertas com sacos plásticos borrifados com água por 12 dias, para estimular o processo infeccioso, que necessita de alta umidade, e para evitar a contaminação cruzada entre as amostras inoculadas e falso-inoculadas. Os vasos foram irrigados manualmente duas vezes ao dia. Um dia (24 h) após a inoculação, quando não haviam sintomas detectáveis, e oito dias (192 h) após a inoculação, quando os sintomas da doença estavam evidentes, o segundo trifólio das planta foi coletado. Após a coleta, todas as amostras de folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. A reação à ferrugem asiática foi checada no décimo segundo dia. O experimento seguiu um delineamento em blocos casualizados num esquema fatorial e com uma estrutura de tratamentos em fatorial, com três fatores: tempo (24 e 192 horas), genótipo (resistente e suscetível), e tipo de infecção (inoculado e falso-inoculado).

### Construção das Bibliotecas Subtrativas de cDNA

O tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido, e o RNA foi extraído utilizando o reagente RNawiz (Ambion, Austin, TX, EUA), segundo as instruções do fabricante. Após a precipitação do RNA com isopropanol, as amostras foram estocadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e então enviadas à Universidade Estadual de Iowa, Ames, EUA, onde o protocolo de extração foi completado e a Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) foi realizada. As amostras de RNA foram resuspensas em  $100\text{ }\mu\text{l}$  de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) contendo o inibidor de RNase (RNaseOUT- Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em  $2\text{ U }\mu\text{l}^{-1}$ . Posteriormente, as amostras foram purificadas por precipitação em cloreto de lítio a 2M. A integridade do RNA foi acessada por eletroforese no bioanalisador Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA) seguida por isolamento do RNA poli ( $\text{A}^+$ ), utilizando o kit Fast Track™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e eluição em água tratada com DEPC.

Para a construção das bibliotecas subtrativas, foi realizada a SSH utilizando  $2\text{ }\mu\text{g}$  de RNA poli ( $\text{A}^+$ ) para cada amostra e o kit PCR Select cDNA Subtraction, da Clontech (Palo Alto, CA, EUA). Quatro bibliotecas SSH de cDNA foram construídas de acordo com as instruções do fabricante. Para isolar as etiquetas de seqüências expressas (“Expressed Sequence Tags” ou ESTs) induzidas pela infecção com ferrugem, as amostras de RNA poli ( $\text{A}^+$ ) da PI 230970 (resistente) e da Embrapa 48 (suscetível), oriundas de folhas coletadas às 24 e 192 h após a inoculação, foram utilizadas como “testers”; os respectivos tratamentos falso-inoculados foram utilizados como “drivers”. As quatro bibliotecas foram denominadas E024, E192 (Embrapa-48 às 24 e 192 horas após a inoculação), P024 e P192 (PI 230970 às 24 e 192 horas após a inoculação) (Figura 1). Os produtos de PCR finais foram enviados à Embrapa Soja, Londrina, Brasil, onde foram clonados no vetor de clonagem pcr 2.1 TOPO T/A (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e transformados, via eletroporação, em células de *Escherichia coli* eletrocompetentes ElectroMAX™ DH10B™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Clones individuais das quatro bibliotecas subtrativas foram tomados ao acaso, cultivados durante uma noite em meio líquido Circle Grow (Bio 101 Systems, Vista, CA, EUA) em placas de 96 poços fundos, e divididos em duas alíquotas: uma para armazenagem em

placas de 384 poços rasos de fundo em U a -80 °C, em meio líquido CG com 25 % de glicerol (v/v), e outra para o isolamento de plasmídios e posterior seqüenciamento.

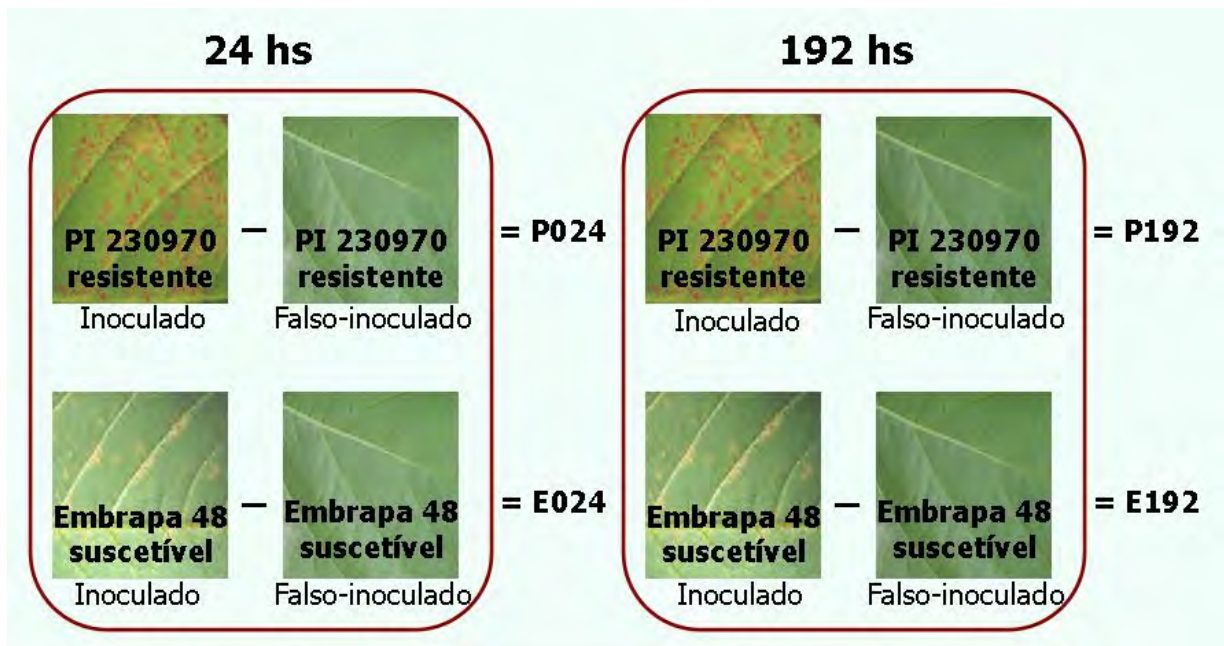


Figura 1: Estratégia de subtração utilizada para a montagem das bibliotecas de cDNA.

#### Seqüenciamento e Análise de ESTs

O seqüenciamento e análise de ESTs foram realizados na Embrapa Soja, Londrina, Brasil. Os plasmídios foram isolados das culturas de bactérias por lise alcalina seguida de purificação em placa MAGV N22 (Millipore, Billerica, MA, EUA) e precipitação com isopropanol. Para verificar o sucesso do isolamento dos plasmídios e eliminar os clones contendo mais que um tipo de seqüência, foi realizada digestão dos mesmos com *EcoRI* ( $1 \text{ u. } \mu\text{g}^{-1}$ ) por 2 horas seguida de análise em eletroforese em gel de agarose a 1 % (m/v). O seqüenciamento unidirecional foi realizado para todos os clones de cDNA utilizando o iniciador T7 e o kit ABI Prism BigDye Terminator. Os fragmentos foram separados e a seqüência obtida utilizando-se o sequenciador de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os arquivos foram

processados utilizando o pacote Phred/Phrap/Consed para remover as seqüências do vetor, dos adaptadores e as caudas poliA, além de atribuir valores de qualidade Phred (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998). Foram consideradas viáveis seqüências com qualidade Phred maior que 20. Foi realizado o alinhamento das seqüências de cada biblioteca individual e do conjunto completo de seqüências (todas as bibliotecas juntas) pelo software CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). O conjunto completo de seqüências de cDNA não-redundante (seqüências únicas) foi consultado na base de dados nr (não-redundante) do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o algoritmo BLASTX para atribuir uma suposta função. Seqüências que não encontraram similaridade significativa foram novamente pesquisadas utilizando BLASTN. Foi utilizado um limiar para a atribuição de similaridade significativa de  $1E^{-8}$ . As ESTs únicas foram classificadas de acordo com categorias funcionais (FunCat) do Munich Information Center for Protein Sequence (MIPs) (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>), utilizando informações da descrição do acesso no GenBank, DBGET, TAIR, Gene Ontology, UniProt e InterPro. Foi calculado o índice de redundância para o conjunto completo de seqüências e das quatro bibliotecas individualmente, utilizando a fórmula: índice de redundância (%) = [(seqüências com qualidade - seqüências únicas) / seqüências com qualidade] x 100. O índice de redundância indica se o número de clones sequenciados foi suficiente para cobrir toda a diversidade existente na biblioteca. Quanto maior o índice, mais adequado foi o número de clones sequenciados. Para se determinar o número de novas ESTs de soja identificadas neste trabalho, o conjunto completo de seqüências únicas foi consultado contra uma base de dados de ESTs local contendo seqüências usadas no “GeneChip Soybean Genome Array” da Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/soybean.affx>) e as seqüências provenientes da base de dados de ESTs da soja do GenBank, utilizando o algoritmo BLASTN e um limiar de significância de  $1E^{-8}$ .

### Construção dos microarranjos de cDNA

Para confirmar a expressão diferencial dos genes únicos, o conjunto completo de seqüências não-redundante foi submetido à análise de microarranjos de cDNA. O procedimento de construção dos microarranjos, das sondas de hibridização e o processo de hibridização foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da UNESP, Jaboticabal, Brasil, segundo protocolo otimizado por SOUZA (2006). Resumidamente, para a construção dos microarranjos, os produtos de PCR de cada EST representando os genes únicos das quatro bibliotecas e mais 20 genes controle artificiais “spike-in” (Universal Lucidea Scorecard, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido), foram arranjados em lâminas de vidro CMT-GAPS2 (Corning, Big Flats, NY, EUA), utilizando o equipamento GMS 417 (Genetic MicroSystems, Woburn, MA, EUA). Cada clone foi impresso em duplicata com pontos de 1,25 mm de diâmetro e 1,25 mm de distância. Após umidificação e secagem, as amostras impressas foram ligadas às lâminas usando uma fonte de UV de baixa energia ( $1.300 \times 100 \mu\text{J cm}^{-2}$ ) por 15 s.

### Marcação Fluorescente dos cDNAs-Alvo

Os cDNAs-alvo utilizados para a hibridização dos microarranjos foram construídos nas mesmas condições utilizadas para a construção da biblioteca subtrativa. Logo, o material vegetal utilizado, os tratamentos aplicados para a construção dos cDNAs-alvo e o procedimento de isolamento do RNA total foram desenvolvidos conforme descrito anteriormente. As condições teste foram denominadas Emb-24, Emb-192 (folhas do genótipo Embrapa 48 às 24 e 192 horas após a inoculação), PI-24 e PI-192 (folhas do genótipo PI 230970 às 24 e 192 horas após a inoculação), e as condições referência (controle) foram os mesmos genótipos nos mesmos horários de coleta, porém falso-inoculados. Foram desenvolvidas três repetições para cada condição. Foi utilizada a técnica de marcação direta do cDNA durante a transcrição reversa com os fluorocromos Cy3 e Cy5 acoplados ao desoxinucleotídeo dUTP, sendo as amostras testadoras marcadas com Cy5 e as referência, com Cy3. A síntese da primeira fita do cDNA foi realizada conforme segue:

15 µg de iniciador randômico (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), 0,4 µg de oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2 µl de cada mRNA controle “spike mix” (Universal Lucidea Scorecard, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) foram adicionados a 20 µg de RNA total, incubados a 70 °C por 5 min e resfriados a 4 °C por 5 min. A esta mistura foram adicionados 4 µl de MgCl<sub>2</sub> a 5 mM; 2 µl de uma mistura de dATP a 0,5 mM, dGTP a 0,5 mM, dCTP a 0,5 mM, dTTP a 0,2 mM; 1,5 µl de Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP a 0,1 mM; 20 U da enzima transcriptase reversa Improm II (Promega, Madison, WI, EUA); e 4 µl tampão da enzima (5x). A reação ocorreu a 40 °C por 3 h e foi terminada adicionando-se 2,5 µl de EDTA 0,5 M (pH 8,0). O RNA foi hidrolizado adicionando-se 5,0 µl de NaOH 1M e incubando-se a 37 °C por 40 min. A reação foi neutralizada adicionando-se 12,5 µl de Tris-HCl a 1M (pH 7,5) e 200 µl de tampão Tris-EDTA a 1M (TE; pH 8,0). Os reagentes não incorporados foram removidos utilizando o filtro Microcon YM-100 (Millipore, Billerica, MA, EUA). A amostra hidrolizada foi adicionada ao filtro contendo 200 µl de tampão TE a 1M, e centrifugada a 10.000 g por 10 min. O filtrado foi descartado e a lavagem foi repetida uma vez com 200 µl de tampão TE. Finalmente, o cDNA alvo marcado foi recuperado adicionando-se 20 µl de tampão TE, invertendo-se o filtro Microcon em um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml e centrifugando a 12.000 g por 10 min.

#### Desnaturação e Hibridização

As lâminas foram hibridizadas com um cDNA teste e seu respectivo controle falso-inoculado. A solução de hibridização, contendo cDNA marcado com Cy3 e Cy5, SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) 20X, SDS (sódio duodecil sulfato) a 2% (m/v) e líquido bloqueador (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), foi aquecida a 95 °C por 2 min para a desnaturação do DNA, e posteriormente foi utilizada para hibridizar os microarranjos de cDNA. As lâminas foram mantidas em câmaras de hibridização na estação GeneTac Hybridization (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, EUA), as quais foram lavadas automaticamente e sequencialmente com as três soluções: SSC 2X / SDS 0,5%, SSC 0,5X e SSC 0,05X, a 25°C. Cada lavagem correspondeu a um período de 15 min, com 10 seg de fluxo e 20 seg de incubação, durante 10 ciclos. O período de

secagem da lâmina na estação de hibridização foi de 15 min. As lâminas foram retiradas da estação e novamente secadas por centrifugação a 800 rpm por 5 min, e submetidas ao escaneamento.

#### Obtenção das Imagens e Análise dos Dados

Os arranjos foram escaneados no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, São Paulo, utilizando o GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A PMT dos dois canais (532 nm e 635 nm) foi ajustada para que a razão das intensidades estivesse em torno de 1. As imagens escaneadas foram normalizadas, para que a razão das médias de todos os pontos ("spots") fosse 1, e analisadas utilizando o ImaGene versão 5.5 (Biodiscovery, El Segundo, CA, EUA). Os pontos que tiveram um valor de regressão menor do que 0,6 foram sinalizados e não incluídos na análise. Uma grade de círculos independentes, correspondentes a cada ponto de DNA nos arranjos foi desenhada sobre a imagem para designar cada ponto a ser quantificado. A quantificação foi calculada pela mediana da intensidade de todos os pixels referentes ao sinal de hibridização de cada ponto. Os pixels classificados como segundo plano foram automaticamente subtraídos pelo programa.

A localização e identificação de cada gene no arranjo foram definidas em um arquivo texto criado com auxílio do programa CloneTracker 2 (Biodiscovery, El Segundo, CA, EUA). Para ajustar as diferenças sistemáticas na intensidade relativa de cada canal, os dados quantificados foram exportados e transformados pelo programa Gene Sight versão 5.5 (Biodiscovery, El Segundo, CA, EUA). A utilização de métodos de suavização de diagramas de dispersão tornou a abordagem mais eficaz na normalização e correção das intensidades das pré-análises estatísticas (QUACKENBUSH, 2002). Este processo, definido como normalização, foi aplicado seguindo os parâmetros de correção "lowess" ("locally weighted linear regression/robust locally weighted regression/local polynomial regression") (CLEVELAND, 1979), com um método de normalização local (o algoritmo é aplicado em subgrupos físicos dos dados, isto é, um "subgrid").

Após a normalização, os dados das repetições dos microarranjos, independentes para o mesmo experimento, foram processados pela ferramenta estatística SAM (“Significance Analysis of Microarray” – CHU et al., 2001) usando o Microsoft Excel. Essa análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos (TUSHER et al., 2001). Para considerar um transcrito como diferencialmente expresso na condição teste em relação à condição controle, foi estabelecido para este trabalho um valor mínimo de “fold change” (FC) igual a 2. Este valor significa que o transcrito foi quatro vezes mais expresso em uma condição do que na outra.

## **Resultados e Discussão**

O estabelecimento de interações entre plantas e fungos biotróficos, como as ferrugens, está associado à ativação de diversas rotas metabólicas de defesa na planta. O presente trabalho visou a identificação e caracterização molecular de transcritos envolvidos nas rotas metabólicas de defesa ativadas em interações compatível e incompatível entre soja e ferrugem. A identificação de genes induzidos pela ferrugem pode proporcionar pistas para elucidar a via de transdução de sinal que leva a resposta de defesa em plantas de soja infectadas pela ferrugem asiática. Nesse trabalho foi realizada a técnica de SSH associada a microarranjos para identificar e caracterizar a expressão de mRNAs associados à resposta à ferrugem.

Foram utilizados dois genótipos de soja para a identificação das seqüências envolvidas na resposta a ferrugem, a Embrapa 48 e a PI 230970. A primeira é uma cultivar com alto potencial e estabilidade de produção, recomendada para plantio principalmente na região sul do Brasil, onde tem sido amplamente utilizada, enquanto que a segunda é uma variedade não adaptada que possui um gene de resistência vertical à ferrugem (*Rpp2*) ainda efetivo no Brasil, após a seleção de uma nova raça fisiológica do fungo que ocorreu em 2003. Os materiais utilizados neste trabalho permitiram o isolamento de seqüências de um importante genótipo suscetível e de um genótipo efetivamente resistente responsivas ao isolado do fungo que tem causado significativas perdas nos campos brasileiros de cultivo de soja nos últimos anos.

A reação à ferrugem foi avaliada aos 12 dias após a inoculação com um isolado de *P. pachyrhizi* mantido na cultivar BRSMS-Bacuri, em ambos os experimentos: de obtenção de material para a construção das bibliotecas subtrativas de cDNA e de obtenção de material para a construção do cDNA-alvo para hibridização dos microarranjos. A cultivar BRSMS-Bacuri foi resistente ao primeiro isolado identificado no Brasil em 2001, mas teve sua resistência quebrada pelo mesmo isolado do campo que quebrou a resistência dos locos *Rpp1* e *Rpp3*. O aparecimento de lesões de coloração bronze na face abaxial de folhas do genótipo suscetível Embrapa 48 (Figura 2A) e de lesões marrom-avermelhadas na face abaxial de folhas do genótipo resistente PI 230970 (Figura 2B) confirmou o fenótipo esperado para interações compatível e incompatível, respectivamente. As plantas controle falso-inoculadas não apresentaram lesões características de ferrugem asiática, comprovando a eficiência do arranjo experimental em evitar a contaminação cruzada.

Quatro bibliotecas subtrativas de cDNA foram construídas, sendo duas para o genótipo suscetível (Embrapa 48) e duas para o genótipo resistente (PI 230970), para os tempos de 24 e 192 horas após a inoculação. Estas bibliotecas foram denominadas E024, E192, P024 e P192. Na construção das bibliotecas foram somente utilizados clones apresentando uma banda única no gel após a digestão. Foi possível verificar uma variação no tamanho dos insertos de 0,3 a 1,3 kb. Após amplificação dos plasmídios e seqüenciamento, um total de 4.704 seqüências foi obtido, sendo 1.904 seqüências da biblioteca E024, 1.360 seqüências da biblioteca P024, 576 seqüências da biblioteca E192 e 864 seqüências da biblioteca P192 (Tabela 1). A proporção relativa de seqüências obtidas para cada biblioteca se adequou ao esperado conforme análise da eletroforese dos produtos da SSH realizada para a montagem de cada biblioteca (dados não apresentados). O tamanho médio das seqüências foi de 325 pb, sendo que 3.821 (81,2%) seqüências apresentaram tamanho maior que 100 pb.



Figura 2: Lesões de ferrugem asiática observadas através de microscópio estereoscópico em plantas de soja aos 12 dias após a inoculação. A: lesões suscetíveis (“tan”) de folha de planta do genótipo Embrapa 48 e B: lesões resistentes (RB) de folha de planta do genótipo PI 230970.

#### Caracterização das Bibliotecas Subtrativas

Com o objetivo de reduzir a redundância nas bibliotecas, as seqüências de cada biblioteca foram alinhadas e consultadas na base de dados nr do GenBank. Algumas seqüências não se agruparam na análise de alinhamento, entretanto, na consulta ao GenBank apresentaram um mesmo acesso como o similar mais significativo. Estas seqüências foram consideradas como pertencentes a um mesmo grupo. O resultado foi um conjunto de seqüências de redundância reduzida para cada biblioteca, totalizando 440 seqüências para a biblioteca E024, 59 seqüências para a biblioteca E192, 44 seqüências para a biblioteca P024 e 243 seqüências para a biblioteca P192.

A maior parte das seqüências consultadas na base de dados nr do GenBank foi similar a acessos de plantas e uma pequena parte foi similar a acessos de fungos, conforme o esperado. Foram identificados também seqüências similares a acessos de outros organismos, como humanos, ácaros e dípteros (dados não apresentados). É provável que amostras mínimas de RNA dos executores do experimento e de pequenos organismos aderidos às folhas de soja tenham sido subtraídas e clonadas, o que comprova a alta sensibilidade do método SSH em enriquecer a população de cDNAs com transcritos raros. Foram encontradas 595 seqüências de plantas, 13 seqüências de fungos, 19 seqüências de outros organismos e 159 seqüências para as quais nenhum similar foi encontrado, considerando o limiar de  $1E^{-08}$  (Figura 3). Na consulta das seqüências similares a acessos de plantas, para 509 seqüências (85,5%) foi utilizado BLASTX e para 86 seqüências (14,5%) foi utilizado BLASTN (Apêndice 1).

Entre as plantas, 83 espécies diferentes foram representadas, sendo a mais abundante soja (*G. max*) com 127 seqüências, de acordo com o esperado. A segunda mais abundante foi arábidoide (*Arabidopsis thaliana*) com 94 seqüências e a terceira foi videira (*Vitis vinifera*) com 90 seqüências (Figura 3). Entre as espécies de fungos, sete no total, *P. pachyrhizi* foi o mais representado, com seis seqüências, seguido de *Ustilago maydis*, com duas seqüências. Estas seqüências podem representar genes importantes de *P. pachyrhizi*, como possíveis elicitores ou genes *Avr*. Até o momento, os trabalhos de identificação de genes da ferrugem asiática foram limitados a transcritos expressos em esporos germinados do fungo (POSADA-BUITRAGO & FREDERICK, 2005). Portanto, não há conhecimento de algum trabalho que tenha clonado transcritos expressos em tecidos fúngicos infectivos da ferrugem asiática.

As seqüências identificadas neste trabalho poderão ser estudadas no futuro visando ampliar o conhecimento das estratégias de infecção de *P. pachyrhizi* e desenvolver métodos eficientes de controle da doença. HUANG et al. (2006) produziram uma linhagem transgênica de arábidoide expressando um RNA de interferência homólogo a proteínas de parasitismo do nematóide causador da podridão da raiz. Mediante esta estratégia, eles obtiveram nesta linhagem resistência a quatro espécies diferentes deste nematóide, algo que não ocorre com nenhum alelo ou

poligene resistente à podridão da raiz. Assim, o estudo das proteínas de parasitismo é importante em virtude de seu potencial de aplicação em estratégias efetivas de controle do patógeno.

Tabela 1: Descrição de cada uma das quatro bibliotecas subtrativas e do conjunto completo de seqüências quanto ao número, qualidade, agrupamento e redundância. Grupos e avulsos representam, respectivamente, “contigs” e “singletons”.

Biblioteca subtrativa	Seqüências produzidas	Seqüências de qualidade <sup>1</sup>	Seqüências agrupadas	Grupos	Avulsos	Únicas	Índice de redundância % <sup>2</sup>
E024	1904	1472 (77,3%)	1320	281	150	431	70,7
E192	576	326 (56,6%)	305	36	18	54	83,4
P024	1360	1154 (84,9%)	1146	34	5	39	96,6
P192	864	855 (99,0%)	738	121	108	229	73,2
Conjunto	4704	3807 (80,9%)	3534	397	273	670	82,4

<sup>1</sup> Seqüências com Phred>20

<sup>2</sup> Índice de redundância =(seqüências de qualidade - seqüências únicas / seqüências de qualidade) x 100

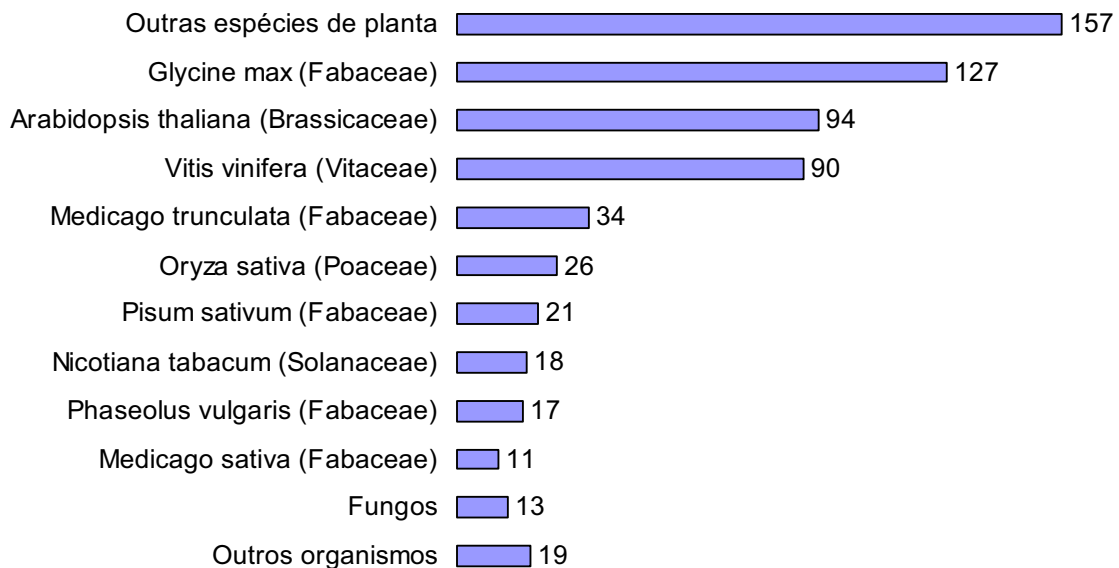


Figura 3: Espécies mais representadas entre os similares encontrados no GenBank para as seqüências das quatro bibliotecas e os respectivos números de similares encontrados.

Eliminando as seqüências similares a acessos de fungos e outros organismos, foram obtidas 431 seqüências únicas para a biblioteca E024, 54 para a biblioteca E192, 39 para a biblioteca P024 e 229 para a biblioteca P192 (Tabela 1). O índice de redundância das quatro bibliotecas variou de 70,7 a 96,6%, indicando que o número de seqüências obtidas foi suficiente para representar mais de 70% da diversidade existente nas bibliotecas. O seqüenciamento adicional de clones poderá incrementar os resultados principalmente para as bibliotecas E024 e P192, as quais obtiveram os mais baixos índices de redundância (cerca de 70%, Tabela 1).

#### Obtenção e Caracterização do Conjunto Completo de Seqüências Únicas

O conjunto de dados completo (as seqüências de todas as bibliotecas juntas) foi submetido à análise de alinhamento, possibilitando identificar seqüências idênticas que foram clonadas em diferentes bibliotecas (aqui chamadas de seqüências co-expressas). Houve seqüências co-expressas para todas as comparações entre bibliotecas, exceto uma (E024 x E192 x P024), num total de 64 seqüências co-expressas (Figura 4). Contando cada seqüência co-expressa apenas uma vez, o resultado é um conjunto de seqüências de redundância ainda mais reduzida, composto por 670 seqüências. O número de ESTs que não encontraram similaridade no GenBank foi reduzido para 149 (22,2% do total). Uma vez que o total de seqüências de qualidade foi 3.807, o índice de redundância do conjunto completo de seqüências foi de 82,4% (Tabela 1). A maior parte das contribuições exclusivas para o conjunto de seqüências únicas veio da biblioteca E024 com 387 seqüências (57,8%), seguida pela P192 com 178 seqüências (26,6%), E192 com 21 seqüências (3,1%) e P024 com 20 seqüências (3,0%) (Figura 4).

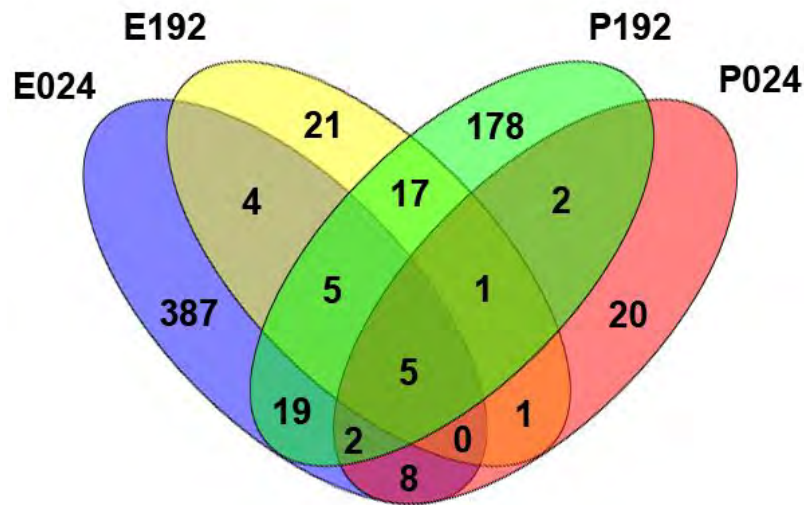


Figura 4: Padrão de co-expressão de seqüências entre as quatro bibliotecas E024, E192, P024 e P192. Os números de seqüências co-expressas são baseados nos resultados de alinhamento entre as seqüências das quatro bibliotecas e nos resultados da consulta ao GenBank.

Foram atribuídas funções moleculares às 670 seqüências “únicas”, obedecendo às subcategorias do FunCat (MIPS). Na Tabela 2 são apresentadas todas as funções moleculares encontradas, a categoria funcional à qual elas pertencem, e o número de seqüências únicas representando cada função molecular (no Apêndice 1 encontra-se a lista completa de seqüências para as quais foram encontrados similares no GenBank e detalhes de sua anotação funcional). As categorias funcionais mais representadas nas quatro bibliotecas foram, nesta ordem: proteção celular, defesa e virulência; metabolismo; energia; dobramento, modificação e destinação protéica; proteína de transporte; síntese protéica; e comunicação celular e transdução de sinal (Figura 5).

Algumas das categorias funcionais mais representadas nas quatro bibliotecas estão comumente envolvidas na resposta a fitopatógenos. A categoria funcional proteção celular, defesa e virulência envolve transcritos de resposta a estresse, proteínas de defesa, proteínas de detoxificação celular, proteínas de degradação de compostos exógenos, como a parede celular ou proteínas estruturais do patógeno, e proteínas análogas a genes de resistência (Tabela 2). A categoria dobramento,

modificação e destinação protéica (Figura 5) abrange as chaperonas e proteínas relacionadas à senescência e à renovação protéica (Tabela 2). A categoria proteínas de transporte (Figura 5) envolve canais iônicos, transportadores de açúcares e transportadores nucleares (Tabela 2). Finalmente, a categoria comunicação celular e transdução de sinal (Figura 5) abrange proteínas de cascatas de fosforilação (MAPKK), receptores transmembrana kinase ou serina/treonina kinase, entre outros (Tabela 2). Além destas categorias claramente relacionadas à defesa, dentro da categoria metabolismo, a segunda mais abundante (Figura 5), foram identificadas seqüências relacionadas a uma via secundária de defesa: a via dos fenilpropanóides, onde são geradas as fitoalexinas, ligninas e moléculas sinalizadoras, como ácido salicílico e ácido jasmônico. Proteínas de todos estes tipos foram identificadas nas bibliotecas produzidas neste trabalho e têm sido frequentemente associadas à resposta de defesa mediada por genes *R* (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; RYALS et al, 1996; RIVAS & THOMAS, 2005; WISE et al., 2007). Além das seqüências identificadas neste trabalho representarem uma contribuição ao conjunto de seqüências de resposta a fitopatógenos disponível atualmente nos bancos de dados, estes dados comprovam a efetividade do método SSH em enriquecer a população de cDNAs com seqüências diferencialmente expressas na situação de doença.

Tabela 2. Funções moleculares expressas exclusivamente em cada uma das quatro bibliotecas e nas combinações de bibliotecas. São apresentadas a categoria funcional, a função molecular exclusiva, e o número (N) de seqüências que representam a função no conjunto completo de seqüências não redundante.

<b>Categoria funcional</b>	<b>Função molecular</b>	<b>N</b>
<b>E024</b>		
Biogênese de componentes celulares	Biogênese de membrana plasmática	2
Ciclo celular e processamento de DNA	Ciclo celular	4
Metabolismo	Biossíntese de polissacarídeos	1
	Biossíntese de fenilpropanóides	1
	Biossíntese de cofatores	1
	Regulação hormonal vegetal	1
	Biossíntese de isoprenóides	3
	Degradação extracelular de polissacarídeos (de parede celular vegetal)	2
	Ciclo da ribulose monofosfato	1
	Assimilação de sulfato	1
Energia	Respiração celular	1
	Complexo piruvato desidrogenase	1
Localização subcelular	Localização: plastídio	1
Síntese protéica	Aminoacil-tRNA sintetase	1
Proteína de estocagem	Proteína de estocagem	1
Transcrição	Transcrição	1
	Metabolismo de RNA	1
Proteína de ligação ou dependente de cofator	Ligação a DNA	1
	Ligação a ácido nucléico	3
	Ligação a RNA	1
Proteína de transporte	Transportadores ABC	1
	Transporte de aminoácidos	2
	Transporte através de poro ou canal	2
	Transporte do ER ao complexo de Golgi	2
	Transporte de metais pesados	2
	Transporte de fosfato	1
	Transporte de proteínas	1
	ATPases de transporte	2
Comunicação celular e transdução de sinal	Transdução de sinal mediada por enzima	1
Dobramento, modificação e destinação protéica	Degradação protéica lisossomal	1
	Degradação protéica no cloroplasto	1
Destinação celular	Morte celular programada	2
Interação sistêmica com o ambiente externo	Resposta brassinosteróide	1
	Resposta a giberelina	1
	Resposta de hipersensibilidade	2

continua...

Tabela 2: (Continuação)

<b>Categoria funcional</b>	<b>Função molecular</b>	<b>N</b>
<b>E024</b>		
Proteção celular, defesa e virulência	Reconhecimento de elicitor	1
	Resposta a UV	1
	Resposta de proteína não dobrada	1
<b>E192</b>		
Metabolismo	Biossíntese de derivados do ácido dehidroquínico	1
Comunicação celular e transdução de sinal	Transdução de sinal mediada por proteína G	1
<b>P024</b>		
Proteína de transporte	Antiporters	1
<b>P192</b>		
Metabolismo	Biossíntese de aminas	1
	Metabolismo de nitrogênio e enxofre	1
Proteína de ligação ou dependente de cofator	Ligação a metal pesado	1
Regulação da atividade protéica	Ativador de protease	1
	Transporte de carboidratos	1
Proteína de transporte	Transporte no cloroplasto	1
	Canais iônicos	3
	Sistema fosfotransferase	2
	Transporte de lipídios	1
	Sistema de secreção tipo V	1
	Interação sistêmica com o ambiente externo	Resposta a estímulo mecânico
Proteção celular, defesa e virulência	Resposta a dano no DNA	2
	Produção de ROS	1
<b>E024 x P024</b>		
Metabolismo	Metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides	2
	Biossíntese de triterpenos	2
Proteína de ligação ou dependente de cofator	Ligação a Ca <sup>2+</sup>	2
Regulação da atividade protéica	Ativador enzimático	1
Proteína de transporte	Transporte celular	2
<b>E024 x P192</b>		
Biogênese de componentes celulares	Biogênese de citoesqueleto	2
	Biogênese de plastídios	2
	Organização da estrutura cromossômica	2
Metabolismo	Biossíntese de ligninas	2
	Biossíntese de porfirinas	2
	Metabolismo de nucleotídeos	4
	Ciclo da S-adenosilmetionina homocisteína	4
Energia	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos	3
Transcrição	Fatores de transcrição	10
	Processamento de RNA	8
Síntese protéica	Fatores de tradução	10
Proteínas de transposons vírus	Transcritase reversa	1

Continua...

Tabela 2: (Continuação)

<b>Categoria funcional</b>	<b>Função molecular</b>	<b>N</b>
<b>E024 x P192</b>		
Proteína de ligação ou dependente de cofator	Ligação a proteína	3
Regulação da atividade protéica	Inibidor de protease	6
Proteína de transporte	Transporte de prótons	4
	Transporte nuclear	3
Comunicação celular e transdução de sinal	Transdução de sinal mediada por Ca <sup>2+</sup>	3
	Cascata de proteínas quinase	9
	Transdução de sinal mediada por polifosfoinositol	4
Dobramento, modificação e destinação protéica	Degradação protéica relacionada a ubiquitina/proteossomo	18
Interação sistêmica com o ambiente externo	Resposta mediada por ácido jasmônico (Lipoxigenases)	5
Proteção celular, defesa e virulência	Detoxificação de íons e radicais	8
	Resposta a estresse	3
<b>E024 x E192 x P024</b>		
Metabolismo	Metabolismo de compostos-C	10
<b>E024 x E192 x P192</b>		
Metabolismo	Metabolismo de aminoácidos	16
Proteína de transporte	Transporte de açúcar	2
Comunicação celular e transdução de sinal	Sinalização por receptor transmembrana serina/treonina quinase	10
Dobramento, modificação e destinação protéica	Modificação protéica	1
Proteção celular, defesa e virulência	Proteínas de defesa	7
<b>E024 x P024 x P192</b>		
Localização subcelular	Localização: membrana	5
Síntese protéica	Proteínas ribossomais	29
Proteína de transporte	Transporte de cátions	2
Dobramento, modificação e destinação protéica	Chaperonas	14
<b>Todas</b>		
Biogênese de componentes celulares	Biogênese de parede celular	7
Metabolismo	Biossíntese de estilbenos e flavonóides	16
	Ciclo de Calvin	4
Energia	Glicólise e neoglicogênese	11
	Fotossíntese	27
Destinação celular	Senescência	1
Dobramento, modificação e destinação protéica	Degradação protéica (local indeterminado)	13
Proteção celular, defesa e virulência	Proteínas relacionadas à patogênese (PR)	3
	Detoxificação por citocromo P450	6
	Degradação de compostos exógenos	9

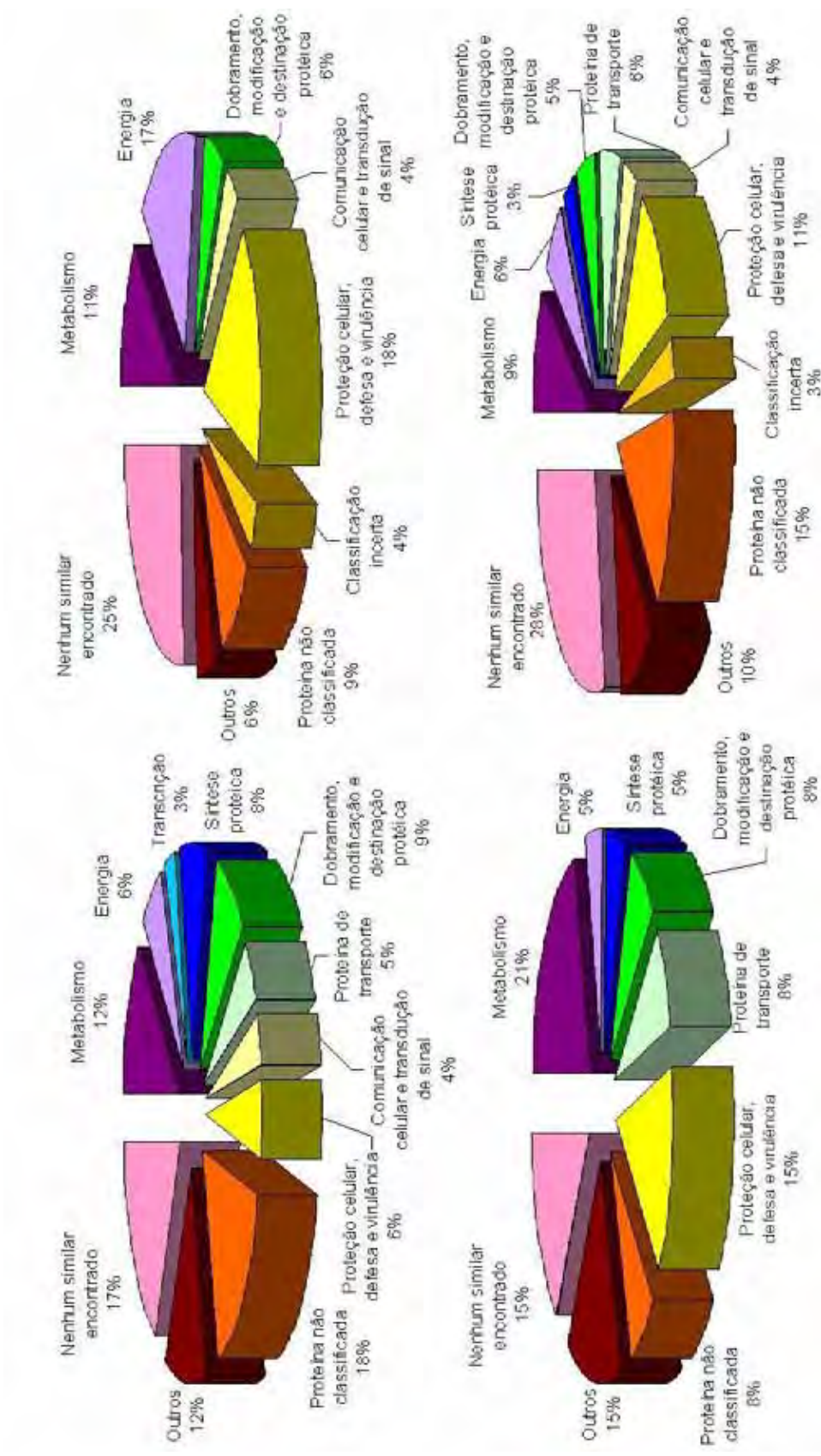


Figura 5: Classificação das supostas funções gênicas das ESTs das bibliotecas subtrativasde acordo com o FunCat 2.0. A: E024, B: E192, C: P024 e D: P192. Para as ESTs classificadas como 'nenhum similar encontrado', não foram encontrados similares nos bancos de dados analisados ou a similaridade encontrada apresentou um valor-e maior que  $1e^{-8}$  para ambos os algoritmos BLASTX e BLASTN.

Pouco mais de 22% do total de seqüências únicas do conjunto completo de seqüências não-redundante não encontrou similaridade significativa na base de dados nr do GenBank (Figura 5). Houve um maior número destas seqüências nas bibliotecas representando estágios mais avançados da infecção (E192 e P192): média de 26,5% contra média de 16% nas bibliotecas de estágios iniciais da infecção (E024 e P024; Figura 5). Este dado demonstra que a maior parte das seqüências da soja responsivas à ferrugem ainda desconhecidas são ativadas em estágios mais avançados da doença.

Neste trabalho foram identificadas seqüências até então não relatadas. Vinte e sete seqüências maiores que 100 pb não encontraram similares entre os acessos do banco de ESTs da soja do GenBank e do “GeneChip Soybean Genome Array” da Affymetrix (Tabela 3), sendo, portanto, ESTs inéditas da soja. Existem atualmente 394.370 ESTs de soja disponíveis na base de dados de ESTs do GenBank (ERPELDING et al., 2002) e as seqüências inéditas identificadas neste trabalho, além de constituírem material para estudos futuros de seqüências da soja que respondem à ferrugem asiática, representam contribuições únicas ao conjunto de ESTs da soja.

#### Análise de Expressão Gênica

Com o objetivo de confirmar a influência das seqüências identificadas na resposta a ferrugem asiática, foi realizada uma análise de expressão gênica através do uso da técnica de microarranjos de DNA. Para isso, o conjunto completo de seqüências únicas (670 seqüências) foi arranjado em lâminas de vidro e hibridizado com cDNAs provenientes de plantas inoculadas com o fungo da ferrugem e plantas controle. No entanto, para apenas 65 das 670 seqüências únicas identificadas nas quatro bibliotecas subtrativas foi confirmada a expressão diferencial nas condições Emb-24, Emb-192, PI-24 e P192 (genótipos Embrapa 48 e PI 230970, ambos às 24 e 192 horas após a inoculação) em relação aos respectivos controles, considerando um “fold change” igual a 2. Dentre elas, oito seqüências foram co-expressas em diferentes combinações de duas condições. Dezesesseis das 65 seqüências não encontraram similaridade significativa na base de dados nr do GenBank, enquanto nove seqüências encontraram similaridade com proteínas desconhecidas, para as quais não foi possível atribuir

função molecular. Finalmente, para 42 das 65 seqüências foi encontrada similaridade com proteínas conhecidas e atribuída uma suposta função molecular (Tabela 4).

#### Rotas Metabólicas Potencialmente Ativadas em Resposta a Ferrugem Asiática

Foi avaliada a expressão nas condições Emb-24, Emb-192, PI-24 e PI-192 dos genes identificados nas bibliotecas E024, E192, P024 e P192. Não houve correlação entre a biblioteca em que o transcrito foi identificado e a condição em que a expressão diferencial do mesmo foi detectada. Para ilustrar, a maior parte dos transcritos únicos (387 seqüências ou 57,8%; Figura 4) foi obtida na biblioteca E024. Entretanto, para a condição Emb-24 foi superexpresso apenas um transcrito, de função desconhecida. Ainda, nas quatro condições avaliadas foram diferencialmente expressos transcritos identificados na biblioteca E024 (Tabela 4). Apesar de ter sido identificada uma quantidade significativa de transcritos relacionados à defesa à ferrugem asiática, o número de horários de coleta utilizado neste experimento para a detecção da expressão diferencial dos mesmos pode não ter sido adequado. Considerando que o objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar transcritos envolvidos na resposta compatível e incompatível à ferrugem asiática, pode-se considerar que o emprego de dois horários de coleta para a montagem da biblioteca foi útil para aumentar sua diversidade, mas insuficiente para inferir sobre o padrão temporal de expressão dos genes clonados, apesar desta análise não ser parte do escopo deste trabalho. Assim, a discussão sobre as possíveis rotas metabólicas ativadas nos genótipos suscetível e resistente não levará em conta o momento em que estes genes foram ativados.

Tabela 3: ESTs inéditas da soja identificadas neste trabalho. São apresentados a identidade da seqüência, o comprimento, a biblioteca de cDNA em que a mesma foi identificada e o resultado da consulta na base de dados nr do GenBank para estas seqüências. As seqüências em destaque foram diferencialmente expressas na análise de microarranjos (Tabela 4).

Identidade	Comprimento	Biblioteca	Anotação funcional
Grupo 26	341	E024	Proteína similar a nam 9 ( <i>Petunia</i> sp, acesso AAM34772; BLASTX; 6E-10)
Grupo 56	169	E024	Clone mth2-84g4 ( <i>M. trunculata</i> , acesso AC168149; BLASTX; 2E-10)
Grupo 59	385	E024	Translocador de fosfolipídeos ( <i>O. sativa</i> , acesso ABF95802; BLASTX; 2E-16)
Grupo 73	411	E024	Nenhum similar encontrado
Grupo 96	349	E024	Proteína de resistência a UVB-8 ( <i>B. rapa</i> , acesso ABV89648; BLASTX; 1E-33)
Grupo 100	197	E024	Nenhum similar encontrado
Grupo 108	510	E024	Selenocisteína metiltransferase ( <i>A. bisulcatus</i> , acesso P56707; BLASTX; 5E-46)
Grupo 109	385	E024, P024	Nenhum similar encontrado
<b>Grupo 123</b>	<b>533</b>	<b>E024</b>	<b>Proteína hipotética similar a poli (A) polimerase (<i>V. vinifera</i>, acesso CAN69980; BLASTX; 4E-57)</b>
Grupo 131	175	E024	Nenhum similar encontrado
Grupo 139	526	E024	Lipoxigenase ( <i>P. vulgaris</i> , acesso ABM88259; BLASTX; 1E-14)
<b>Grupo 142</b>	<b>379</b>	<b>E024</b>	<b>Protéina não nomeada similar à chaperonina GroEL (<i>V. vinifera</i>, acesso CAO15358; BLASTX; 2E-17)</b>
Grupo 197	388	E024	Proteína hipotética ( <i>V. vinifera</i> , acesso CAN70590; BLASTX; 5E-59)
Grupo 216	560	E024	Proteína desconhecida ( <i>A. thaliana</i> , acesso NP_197156; BLASTX; 2E-64)
Grupo 220	451	E024	Proteína associada a resistência a multidrogas ( <i>A. thaliana</i> , acesso NP_191829; BLASTX; 6E-51)
Grupo 243	501	E024	MAPKK ( <i>N. tabacum</i> , acesso BAE95414; BLASTX; 9E-14)
Grupo 305	534	E024, P192	Nenhum similar encontrado
Grupo 315	538	P192	Cisteína sintase ( <i>G. max</i> , acesso ABO15564; BLASTX; 9E-44)
Grupo 319	947	P192	Nenhum similar encontrado
<b>Grupo 330</b>	<b>497</b>	<b>P192</b>	<b>antranilato n-hidroxicinamil/benzoiltransferase (<i>V. vinifera</i>, acesso CAO41774; BLASTX; 4E-34)</b>
Grupo 373	709	P192	Nenhum similar encontrado
Grupo 383	335	P192	Proteína não nomeada com domínio de transportador de lipídeos ( <i>V. vinifera</i> , acesso CAO62526; BLASTX; 6E-40)
Grupo 384	418	P192	Nenhum similar encontrado
Grupo 387	541	P192	Nenhum similar encontrado
Grupo 395	668	P192	Nenhum similar encontrado
Grupo 402	429	E024	Citrato sintase ( <i>C. maxima</i> , acesso P49299; BLASTX; 1E-54)

Tabela 4: Sequências diferencialmente expressas, segundo análise de microarranjos, para as quais foi encontrado um similar significativo (valor-e máximo 1E<sup>-6</sup>). São apresentados a identidade da sequência, o similar de mais alta significância, a espécie à qual o similar pertence, o valor-e, o algoritmo utilizado na comparação, a condição teste em que a sequência foi diferencialmente expressa e o “fold change” (FC), considerando como limite FC=2. Valores de FC maiores e menores que zero indicam, respectivamente, se a sequência foi superexpressa ou subexpressa na amostra testadora (inoculada), em relação a referência (falso-inoculada) correspondente. Emb-24 e Emb-192: genótipo Embrapa 48 às 24 e 192 horas após a inoculação, respectivamente. PI-24 e PI-192: genótipo PI 230970 às 24 e 192 horas após a inoculação, respectivamente.

Identidade	Similar	Função molecular	Espécie	Valor-e	Algoritmo	Condição	FC
P35_F05	Proteína ribossomal L7A	Proteínas ribossomais	<i>A. thaliana</i>	6E-18	BLASTX	Emb-192	7,4
P36_E03	Proteína ribossomal L44	Proteínas ribossomais	<i>G. hirsutum</i>	3E-12	BLASTX	Emb-192	3,7
P40_G07	Proteína ribossomal L6	Proteínas ribossomais	<i>M. crystallinum</i>	8E-16	BLASTX	Emb-192	2,6
P41_D08	Similar a proteína ribossomal L19	Proteínas ribossomais	<i>G. urafensis</i>	8E-12	BLASTN	Emb-192	2,2
P28_F02	Treonina sintase	Biossíntese de treonina	<i>G. max</i>	2E-33	BLASTX	Emb-192	3,0
P35_A06	Suposto precursor da auxina-amidase	Biossíntese de auxina	<i>Populus sp.</i>	4E-59	BLASTX	Emb-192 PI-192	2,1 3,5
P19_E11	Suposta proteína de ligação à clorofila a/b	Fotossíntese	<i>A. thaliana</i>	3E-65	BLASTX	Emb-192	2,4
P13_D08	Rubisco ativase alfa 2	Ciclo de Calvin	<i>G. hirsutum</i>	1E-152	BLASTX	Emb-192	2,4
P20_H09	Transportador de magnésio similar a CorA	Transporte de cátions	<i>A. thaliana</i>	3E-29	BLASTX	Emb-192	7,0
P40_C06	Produto protéico não nomeado similar a carioferina (importina) beta	Transporte nuclear	<i>V. vinifera</i>	4E-43	BLASTX	Emb-192	3,8
P41_E12	Suposta proteína endomembrana 70	Transporte de prótons	<i>A. thaliana</i>	6E-32	BLASTX	Emb-192	2,6
P40_H02	Proteína hipotética, suposta serina-protease similar a tripsina periplasmática	Degradação de compostos exógenos	<i>V. vinifera</i>	2E-13	BLASTX	Emb-192 PI-192	2,1 3,4
P21_C01	SINA1	Degradação protéica por ubiquitina/proteossomo	<i>M. trunculata</i>	7E-81	BLASTX	Emb-192	2,3
P38_B09	Poliubiquitina	Degradação protéica por ubiquitina/proteossomo	<i>T. aestivum</i>	2E-72	BLASTX	Emb-192	2,5

Continua...

Tabela 4: (Continuação)

Identidade	Similar	Função molecular	Espécie	Valor-e	Algoritmo	Condição	FC
P39_H01	Chaperona molecular HSP90-2	Dobramento e modificação protéica	<i>N. tabacum</i>	4E-39	BLASTX	Emb-192	2,2
P40_D01	Produto protéico não nomeado similar a chaperonina GroEL tipo 1	Dobramento e modificação protéica	<i>V. vinifera</i>	1E-42	BLASTX	Emb-192 PI-192	2,2 0,28
P35_C04	RNA-Helicase ATP-dependente	Metabolismo de RNA	<i>A. thaliana</i>	6E-10	BLASTN	Emb-192 PI-24	4,3 2,6
P38_B04	Produto protéico não nomeado, suposta proteína associada a U1 RNAp <sub>n</sub> (LUC7)	Processamento de mRNA	<i>V. vinifera</i>	3E-46	BLASTX	Emb-192	3,3
P35_E04	Proteína hipotética com domínio central poli(A) polimerase	Processamento de mRNA	<i>V. vinifera</i>	4E-57	BLASTX	Emb-192	3,1
P36_E12	EF-1 gama	Controle traducional	<i>M. trunculata</i>	7E-32	BLASTX	Emb-192	2,3
P29_A09	EF-1 alfa	Controle traducional	<i>P. sativum</i>	3E-11	BLASTN	Emb-192 PI-24	2,6 2,1
P37_E10	Produto protéico não nomeado similar a família 3-beta hidroxisteróide desidrogenase/isomerase	Metabolismo de lipídeos, ácido graxos e isoprenóides	<i>V. vinifera</i>	1E-46	BLASTX	Emb-192	2,7
P40_G11	Peroxidase2	Reação de peroxidação	<i>M. sativa</i>	2E-30	BLASTX	Emb-192	2,5
P40_C09	Superóxido dismutase férrica	Metabolismo superóxido	<i>G. max</i>	1E-52	BLASTX	Emb-192	3,0
P48_A01	Quitinase	Degradação de compostos exógenos	<i>P. vulgaris</i>	2E-55	BLASTX	Emb-192	2,5
P42_B08	Inibidor de proteinase I9 (subtilisina)	Inibidor de protease	<i>M. trunculata</i>	2E-45	BLASTX	Emb-192	2,1
P46_C04	Precursor da PR1a	Proteína PR	<i>G. max</i>	1E-50	BLASTX	Emb-192	2,7
P11_E04	Suposta proteína associada a senescência	Senescência	<i>P. sativum</i>	5E-64	BLASTX	Emb-192	6,6
P41_C10	Bomba de prótons ancorada à membrana vacuolar energizada por pirofosfato	Transporte de prótons	<i>V. radiata</i>	6E-33	BLASTX	Emb-192	0,26
P44_E12	Similar a receptor de proteína quinase RK20-1	Proteína receptora ser/tre quinase	<i>P. vulgaris</i>	1E-50	BLASTX	Emb-192	0,33
P38_E06	Produto protéico não nomeado similar à proteína "scythe"	Apoptose	<i>V. vinifera</i>	2E-13	BLASTX	Emb-192 PI-192	0,37 0,30

Continua...

Tabela 4: (Continuação)

Identidade	Similar	Biossíntese de parede	G. max	3E-14	BLASTX	Emb-192	0,25	FC
		Função molecular	Espécie	Valor-e	Algoritmo	Condição		
P35_B05	Anquirina	Proteína de ligação a proteína	<i>M. trunculata</i>	1E-68	BLASTX	PI-24		2,2
P20_D06	Proteína similar a germina	Proteína de estocagem / Produção de ROS	<i>P. sativum</i>	7E-81	BLASTX	PI-24		7,6
P36_H04	Similar a 4-cumarato CoA ligase	Biossíntese de estilbenos e flavonóides	<i>A. thaliana</i>	1E-26	BLASTX	PI-24		2,3
P36_H01	antrnilato n-hidroxicinamil/benzoiltransferase	Biossíntese de estilbenos e flavonóides	<i>M. trunculata</i>	4E-18	BLASTX	PI-24		2,8
P36_C06	Aquaporina PIP2-7	Transporte por poro ou canal	<i>Z. mays</i>	2E-66	BLASTX	PI-192		3,3
P40_E09	Relacionado a translocação de fosfato	Transporte de fosfato	<i>A. thaliana</i>	2E-32	BLASTX	PI-192		3,1
P40_C10	Proteína hipotética similar a ubiquitina ligase	Degradação protéica por ubiquitina/proteossomo	<i>O. sativa</i>	5E-13	BLASTX	PI-192		3,6
P43_H10	Produto protéico não nomeado com domínio PINT	Degradação protéica por ubiquitina/proteossomo	<i>V. vinifera</i>	1E-33	BLASTX	PI-192		0,32
P40_A04	Proteína induzida pelo frio (L13e)	Proteína ribossomal	<i>B. rapa</i>	4E-26	BLASTX	PI-192		0,26

### Proteínas com Estrutura Análoga a Genes de Resistência

Foi identificada a subexpressão de uma proteína receptora quinase (RK20-1) no genótipo suscetível (Tabela 4). As proteínas receptoras quinases desempenham papel no desenvolvimento das plantas como receptores para moléculas ligantes específicas. Elas também são parte do arsenal de defesa que pode reconhecer patógenos invasivos e ativar respostas de defesa. A indução de proteínas receptoras quinase já foi relatada como resposta a infecção por patógenos (LANGE et al., 1999). Em alguns casos, tais proteínas funcionam como genes *R* supostamente capazes de se ligar a moléculas elicitoras do patógeno. O gene *Xa21* de resistência a *Xanthomonas oryzae* em arroz, os genes *Ve1* e *Ve2* de resistência a *Verticillium albo-atrum* em batata e o gene *RPP27* para resistência a *Peronospora parasitica* em arábida, também possuem estrutura de proteínas receptoras quinases (SONG et al., 1995; RIVAS & THOMAS, 2005).

Como a maioria das proteínas receptoras quinases, as identificadas neste trabalho são do tipo serina/treonina. Uma proteína desta classe, a CTR1 de arábida, se liga ao receptor de etileno ETR1 desligando a via de sinalização de etileno (HUANG et al., 2003). Ainda, o NTHK1 de tabaco é um receptor de etileno com atividade ser/tre quinase (XIE et al., 2003). Sendo assim, a subexpressão da proteína receptora quinase identificada neste trabalho pode ter relação com outros processos, como a manutenção da via de sinalização de etileno no genótipo suscetível, o qual sabe-se estar envolvido com a senescência celular. Em genótipos suscetíveis, a clorose e senescência precoce das folhas são os sintomas mais evidentes da infecção por ferrugem asiática e, ainda, são os principais causadores das perdas de produção associadas a esta doença.

### Sinalização das Respostas de Defesa Mediada por Proteínas

Foi detectada exclusivamente no genótipo resistente a superexpressão de um similar da proteína anquirina (Tabela 4). As anquirinas específicas de plantas são proteínas multifuncionais capazes de se ligar a outras proteínas desencadeando as respostas de defesa das plantas. Foi proposto que algumas anquirinas estabeleçam relação entre as respostas de defesa e o metabolismo de carboidratos. Aparentemente, o acúmulo de açúcares ativa a resposta de hipersensibilidade (HR) e ambos, o

metabolismo de açúcar e a HR, são controlados pela anquirina, provavelmente porque ela se liga a transportadores de açúcar, inibindo-os. Uma anquirina de soja foi descrita como capaz de se ligar a um simporter sacarose/H<sup>+</sup>, que leva à exportação de açúcar em células foliares. Quando este simporter está subexpresso, ocorrem, entre outros sintomas, as lesões tipo HR (WIRDNAM et al., 2004). Em *arabidopsis* foi demonstrado que a anquirina AKR2 é capaz de se ligar à ascorbato peroxidase 3 (YAN et al., 2002) e uma outra anquirina é rapidamente fosforilada em resposta a tratamento com elicitores como quitina. Logo, é possível que sua ativação seja dependente da presença de elicitores fúngicos (PECK et al., 2001). A proteína ACD6 de *arabidopsis* possui domínio transmembrana e uma região característica de anquirina. Esta proteína foi comprovada como necessária e ativadora dose-dependente da resposta de defesa contra bactéria virulenta e ativadora da morte celular associada a HR dependente de SA (LU et al., 2003). Assim, parece que, controlando o funcionamento de proteínas do transporte de açúcar e do metabolismo oxidativo, a anquirina controla o desenvolvimento da HR. Ainda, foi visto que proteínas anquirinas podem se ligar a fatores de transcrição do tipo bZIP TGA/OBF, os quais por sua vez ligam-se aos promotores de genes *PR1* ativando sua expressão (LIM et al., 2006). Este achado reforça o papel da anquirina como sinalizadora das respostas de defesa.

#### Sinalização Hormonal

O gene do precursor da auxina amidahidrolase foi superexpresso em ambos os genótipos (Tabela 4). As auxina amidahidrolases hidrolizam conjugados inativos de auxina com amidas, regulando as concentrações de auxina livre ativa (CAMPANELLA et al., 2004). Um crescente número de evidências indicam que muitos patógenos de plantas podem produzir auxina ou manipular a biossíntese de auxinas no hospedeiro para interferir com os processos normais de desenvolvimento (WANG et al., 2007). Entretanto, sabe-se que a atividade de peroxidação, que foi detectada em ambos os genótipos (e será explicada mais adiante), é capaz de promover a degradação da auxina. Se a auxina livre ativa na célula é continuamente degradada pelas peroxidases, a ativação da auxina amidahidrolase viria a repor o estoque de auxina ativa na célula. Apesar de ambas as hipóteses serem plausíveis, a função da ativação do precursor da

auxina amidahidrolase em resposta à infecção fúngica não foi abordada na literatura e ainda está para ser esclarecida.

#### Mudanças na Expressão Gênica Controladas ao Nível Transcricional e Traducional

A RNA-helicase ATP-dependente e o fator de alongação da tradução EF1- $\alpha$  foram superexpressos em ambos os genótipos suscetível e resistente (Tabela 4). Além deles, uma poli(A) polimerase, uma suposta proteína associada a U1 RNApn (similar a LUC7) e o EF1- $\gamma$  foram superexpressos exclusivamente no genótipo suscetível (Tabela 4).

São escassas as informações da literatura que esclarecem o papel de fatores de alongação da tradução nas respostas de defesa de plantas. A indução de um fator de alongação da tradução (EF-Tu) em ervilha após tratamento com baixa temperatura e aplicação de SA, uma das mais importantes moléculas sinalizadoras de defesa contra doenças em plantas, foi demonstrada previamente (SINGH et al. 2004). Sabe-se que em *Xenopus* o EF1-  $\gamma$  é capaz de se ligar ao proteossomo 26S para a regulação do rápido ciclo celular no embrião (TOKUMOTO et al., 2003). Ainda, em vertebrados, o EF1-A tem sido sugerido como um potente indutor de apoptose (MINAMI et al., 2007).

A helicase identificada neste trabalho pertence à família das helicases DEAD e DEAH box. As helicases DEAD box estão envolvidas em vários aspectos do metabolismo de RNA, incluindo transcrição, pré-processamento do mRNA, biogênese de ribossomo, transporte nucleocitoplasmático, tradução, declínio de RNA e expressão gênica organelar. Uma helicase de RNA ATP-dependente da família DEAD box foi expressa em resposta a estresse oxidativo em *Candida albicans* (WANG et al., 2006). A relação entre esta proteína e a resposta a patógenos em plantas ainda não foi elucidada.

A função do fator associado a RNApn-U1 LUC7, juntamente com outras proteínas associadas, é mediar o “splicing” alternativo (PUIG et al., 2007). Em humanos, sabe-se que a apoptose induzida por um composto fenólico vegetal envolve alteração na fase G2/M por U1B e U4-U6 (MANNA et al. 2006). Não foi encontrada na literatura informação relacionando RNAPns e respostas a patógenos em plantas.

A extremidade 3' da maioria dos mRNAs de eucariotos é gerada por uma reação de dois passos: clivagem endonucleolítica do transcrito primário, seguida de adição de resíduos de adenilato. A proteína poli(A) polimerase (PAP) cria e adiciona a cauda poli(A) ao transcrito primário (ELLIOTT et al., 2003). A relação entre esta proteína e a resposta a patógenos em plantas ainda não foi abordada na literatura.

#### Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Foi detectada exclusivamente no genótipo resistente a superexpressão de um similar da proteína PR germina, com um alto FC (7,6; Tabela 4). Foram também superexpressas no genótipo suscetível a superóxido dismutase férrica (FeSOD) e a proteína PR peroxidase 2 (Tabela 4).

Germinas são glicoproteínas de parede celular que, em geral, apresentam função de oxalato oxidase (GUCCIARDO et al., 2007). A oxalato oxidase produz peróxido de hidrogênio através da quebra oxidativa do oxalato. Recentemente, foi identificada a indução de proteínas similares à germina em videira em resposta ao ataque por *Erysiphe necator* (GODFREY et al., 2007), e em soja, em células sinciciais de raízes colonizadas pelo nematóide do cisto aos oito dias após a inoculação (KLINK et al., 2007).

A superóxido dismutase (SOD) reduz o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio. Existem três classes de SOD, as quais diferem em função do metal presente no sítio catalítico ativo: as CuZnSOD, as MnSODs e as FeSODs, presentes no cloroplasto e citosol (MORAN et al., 2003). Uma nova função para a FeSOD foi proposta pelo trabalho de SHARMA et al. (2004). Os autores isolaram uma RIP, proteína inibidora do ribossomo, em tabaco com alta identidade de seqüência e atividade comprovada de FeSOD. As RIPs atuam sobre os ribossomos removendo resíduos de adenina do rRNA. Neste trabalho os autores demonstraram que a Fe-SOD de *Escherichia coli* é capaz de remover resíduos de adenina de ribossomos e que a RIP isolada de tabaco é capaz de conter o crescimento de fungos. As RIPs podem inibir a síntese protéica do patógeno ou controlar o seu desenvolvimento inibindo sua própria síntese protéica, num mecanismo de suicídio defensivo.

As peroxidases são enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. Estas enzimas conferem resistência basal à planta devido a seu envolvimento no reforço à parede celular. A peroxidase cataliza o último passo na via de lignificação da parede celular e de papilas formadas em sítios de penetração fúngica, e ainda está envolvida na deposição de polifenóis à parede celular, no estabelecimento de ligação cruzada de proteínas e na polimerização de suberina. Ainda, as ROS, como o peróxido de hidrogênio, podem atuar como agentes antimicrobianos diretos e sinalizar mudanças na expressão gênica. A superexpressão de peroxidase tem sido utilizada para conseguir o aumento da resistência a patógenos (WAY et al., 2000).

#### Indução de Morte Celular

Um similar à proteína Scythe foi subexpresso em ambos os genótipos (Tabela 4). A proteína Scythe é um regulador da apoptose que é altamente conservado em eucariotos e contém um domínio ubiquitina próximo à extremidade N. A inativação de Scythe em camundongo resultou em letalidade por defeitos na organogênese e apoptose aberrante amplamente espalhada. Em cultura de células humanas, Scythe interage com AIF, um fator de indução da apoptose, regulando sua estabilidade, através de um mecanismo envolvendo o proteossomo (DESMOTS et al., 2007). O terminal N de Scythe interage com o EF1-A de *Xenopus laevis* (XEF1AO), aumentando a poliubiquitinação e subsequente degradação do XEF1AO. Como o XEF1AO é um potente indutor apoptótico, a apoptose induzida pelo acúmulo de XEF1AO pode ser suprimida pela co-expressão da proteína Scythe (MINAMI et al., 2007). Estes dados sugerem que Scythe é um supressor de apoptose e que sua subexpressão pode permitir o desenvolvimento da apoptose associada a HR.

#### Degradação Protéica Associada à Via Ubiquitina/Proteossomo

As proteínas envolvidas na via de degradação da ubiquitina/proteossomo foram abundantes nas quatro bibliotecas de cDNA e, ainda, tiveram representantes diferencialmente expressos em ambas as bibliotecas. Similares das proteínas SINA1 e poliubiquitina foram superexpressos no genótipo suscetível, enquanto um similar de

uma ubiquitina ligase foi superexpresso no genótipo resistente. Já uma proteína com domínio PINT foi subexpressa no genótipo resistente (Tabela 4).

A ubiquitinação, que é a ligação da ubiquitina a proteínas direcionando-as à degradação, regula muitos processos em células eucarióticas, variando de divisão celular a sinalização para morte celular. Há três tipos principais de sinais de ubiquitinação: 1) monoubiquitinação, que proporciona sinais para a degradação lisossômica, reparo de DNA, regulação de histonas e exporte nuclear; 2) poliubiquitinação ligada a Lis-63 que está envolvida no reparo de DNA, degradação lisossômica e ativação protéica; e 3) poliubiquitinação ligada a Lis-48, que é essencial para enviar proteínas para o proteossomo 26S para a degradação e, em alguns casos, renovação. Existe um número crescente de evidências que ligam a via ubiquitina/proteossomo à defesa contra patógenos: algumas proteínas de ubiquitinação são ativadas por elicitores derivados de patógenos; alguns genes de resistência são rapidamente desestabilizados sob interação com patógenos, necessitando de renovação mediada por proteossomo; algumas proteínas desta via são supressoras da morte celular, indicando a existência de regulação negativa da defesa a patógenos mediada pela via ubiquitina proteossomo (RIVAS & THOMAS, 2005; DONG et al., 2006).

O domínio PINT existe em proteínas do proteossomo. A relação entre a subexpressão de proteína com domínio PINT e o estabelecimento da resistência é desconhecida. Foi demonstrado em drosófila que a ausência de *Rpn6*, uma subunidade não-ATPase do complexo de regulação do proteossomo, leva à letalidade do embrião, possivelmente devida a apoptose. Esta proteína tem um domínio PINT, o qual é utilizado para a ligação a outras proteínas regulatórias controlando o desenvolvimento de drosófila (LIER & PAULULAT, 2002).

As proteínas SINA são E3 ligases, cuja função é ligar a ubiquitina a proteínas mediando a degradação das mesmas no proteossomo. Algumas E3 ligases possuem sítio de ligação à quitina, desencadeando a resposta de resistência basal ativada por elicitador (HÜCKELHOVEN, 2007). Em arábido, SINAT5 liga-se a NAC1, um fator de transcrição único de plantas, ubiquitinando-o, o que o leva à degradação. Como a produção de auxina é controlada pelo NAC1, a SINAT5 inibe a sinalização de auxina

(XIE et al., 2002). Outra SINA de arabidopsis, a SINAT2, interage com o fator de transcrição AtRAP2.2 na biossíntese de carotenóides em folhas (WELSH et al., 2007).

### Chaperonas

A chaperona HSP90-2 foi superexpressa no genótipo suscetível, enquanto a chaperonina similar a GroEL tipo 1 foi superexpressa no genótipo suscetível e subexpressa no resistente (Tabela 4).

As proteínas de choque térmico são proteínas altamente conservadas conhecidas por estabilizar e facilitar o re-dobramento de proteínas que tenham sido desnaturadas e realizar o dobramento de proteínas nascentes e o seu transporte intracelular. Estudos recentes indicam a interação de HSP90 a uma grande variedade de proteínas de sinalização, incluindo receptores de esteróides, fatores de transcrição e ser/tre quinases. Em tabaco, a HSP90 citosólica é um componente essencial da resposta hipersensitiva mediada pelo INF1 (KANZAKI et al., 2003). A proteína I-2 do tomateiro, que confere resistência a *Fusarium oxysporum*, interage com uma HSP90, sendo esta interação necessária para o desenvolvimento da morte celular vinculada a HR (BENTEM et al., 2005).

As chaperoninas são uma classe de chaperonas que ocorrem em procariotos e na mitocôndria e plastídios de eucariotos. Foi descoberto que uma chaperonina 60 (Cpn60) de arabidopsis, homóloga ao protótipo bacteriano GroEL, quando deletada desencadeia morte celular, levando ao estabelecimento de resistência sistêmica adquirida (SAR) na planta (ISHIKAWA et al., 2003). Assim, a subexpressão desta proteína no genótipo resistente pode ter relação com o estabelecimento da morte celular no local de infecção. Por que razão ela seria superexpressa no genótipo suscetível não se sabe.

### Produção de Fitoalexinas

Foram detectadas exclusivamente no genótipo resistente a superexpressão de um similar da 4-cumarato CoA ligase (4CL) e um similar da antranilato N-hidroxicinamil/benzoiltransferase (HCBT) (Tabela 4). A 4-cumarato CoA ligase (4CL) participa da via fenilpropanóide, convertendo o 4-cumarato e outros 4-hidroxicinamatos aos seus

correspondentes CoA-ésteres tióis. Já a HCBT atua sobre os CoA-ésteres tióis, como benzoil-, cinamil- ou 4-cumaroil-CoA, produzindo precursores para a biossíntese de produtos como lignina, flavonóides, estilbenos, como as diantramidas, e pequenos compostos fenólicos. Os estilbenos e os flavonóides destacam-se por sua potente atividade antimicrobiana, inibindo a germinação de esporos e o crescimento de hifas. As ligninas reforçam a parede celular no local de infecção. Em plantas de cravo a expressão das diantramidas foi comprovada ser necessária para a resistência horizontal a patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum* ou *Phytophthora parasitica*. Foi descoberto que o promotor do gene da HCBT possui regiões responsivas a elicitores, as quais são rapidamente ativadas em resposta ao elicitador fúngico *Pmg* (proteína de parede celular de *Phytophthora megasperma*) (YANG et al., 1997, 1998; EHLTING et al., 2001). Foi proposto, ainda, que a 4CL esteja também envolvida na ativação de precursores biossintéticos do ácido jasmônico (JA), uma importante molécula sinalizadora em processos de defesa em plantas, em peroxissomos foliares (KOO et al., 2006).

#### Proteínas Antimicrobianas

Foi identificada em ambos os genótipos uma serina protease tipicamente periplasmática (Tabela 4). Ainda, somente no genótipo suscetível, a análise de microarranjos revelou a superexpressão de similares das supostas proteínas PR quitinase, inibidor de proteinase I9 e ao precursor da PR1a.

A serina protease atua no controle do crescimento fúngico e na produção de peptídios fúngicos elicitores da resposta de defesa (TIAN et al., 2007). Foi visto que proteína relacionada à patogênese (PR) P69B de tomate, uma serina protease apoplástica, acumula-se sob infecção com o oomiceto *Phytophthora infestans* (TIAN et al., 2004). As quitinases hidrolizam as ligações  $\beta$ -1,4 entre os resíduos N-acetilglicosamina da quitina, um polissacarídeo estrutural da parede celular de muitos fungos. Estas enzimas incentivam a defesa não específica da planta mediante a liberação de oligômeros de quitina, os quais são moléculas elicitoras (HÜCKELHOVEN, 2007).

Patógenos que invadem os tecidos vegetais utilizam uma série de proteases como parte de seus fatores de virulência. As plantas, em paralelo, evoluíram genes codificando inibidores que inativam algumas destas proteinases e assim podem reduzir a habilidade do patógeno de digerir as proteínas do hospedeiro, limitando a disponibilidade de nitrogênio para o invasor. Aumento nas atividades inibitórias de tripsina e quimotripsina foi detectado em folhas de tomate em resposta a infecção por *Phytophthora infestans* (JAYARAJ et al., 2004). As proteínas PR-1 são proteínas encontradas no apoplasto e vacúolos das células vegetais após indução por infecção com patógenos. Foi constatado que o peróxido de hidrogênio é um indutor da expressão desta proteína. A forte indução das mesmas por episódios de doença levou a sua utilização como marcador de infecção efetiva. Apesar de seu envolvimento nas respostas de defesa a patógenos, sua função ainda não foi claramente estabelecida (JAYARAJ et al., 2004).

#### Reforço na Parede Celular

Além da anteriormente citada peroxidase, um similar da proteína extensina da soja foi subexpresso no genótipo suscetível (Tabela 4).

A extensina, uma proteína rica em hidroxiprolina, é uma das maiores proteínas de parede. Sua ligação cruzada à parede celular, juntamente com outros componentes, mediada por peróxido de hidrogênio, poderia contribuir para o reforço da parede, levando à limitação no crescimento do volume celular. O estresse oxidativo também pode limitar o crescimento induzindo a ligação cruzada e lignificação dependentes da peroxidase (CAZALÉ et al., 1998). A inibição da extensina pode ser requerida para o estabelecimento da biotrofia em interações compatíveis.

#### Alterações no Metabolismo de Aminoácidos

O gene da treonina sintase foi superexpresso no genótipo suscetível (Tabela 4). Não foi encontrada na literatura relação entre este gene e a resposta a patógenos em plantas. Entretanto, foi verificado que em *Phytophthora infestans* este gene e outros do metabolismo de aminoácidos são fortemente induzidos durante a germinação dos esporos, formação de apressório e durante a fase biotrófica em plantas de batata

(GRENVILLE-BRIGGS et al., 2005). Assim como a expressão dos genes da auxina é manipulada pelo patógeno em plantas (WANG et al., 2007), pode ser que este gene seja ativado por alguma molécula do patógeno. Algumas evidências sustentam esta idéia. Foram isolados de uma biblioteca de cDNA específica de haustórios mRNAs de três transportadores de aminoácidos diferentes (HAHN & MENDGEN, 1997), sendo que um destes mRNAs é expresso exclusivamente nos haustórios. Isto sugere que aminoácidos produzidos na planta são bombeados para dentro das células do patógeno. KEMEN et al. (2005) detectaram proteínas das ferrugens *Uromyces fabae* e *U. striatus* no citoplasma de células hospedeiras de *Vicia fabae* e *Medicago sativa*, respectivamente, em contato com haustórios. Em bactérias fitopatogênicas, o sistema de secreção tipo III envia proteínas bacterianas para dentro do citoplasma da célula hospedeira. Estas proteínas podem funcionar como fatores de transcrição (LAHAYE & BONAS, 2001), alterando a expressão gênica da célula hospedeira. Entretanto, estas são somente idéias sobre razão da treonina sintase ter sido induzida no genótipo suscetível. Outros estudos seriam necessários para se saber se fatores fúngicos seriam ou não capazes de ativar a expressão de genes da planta hospedeira.

#### Alterações no Transporte de Substâncias

Similares do transportador de magnésio CorA, carioferina e suposta proteína endomebrana 70, foram superexpressos enquanto que um similar da bomba de prótons vacuolar energizada por pirofosfato foi subexpresso no genótipo suscetível. Similares da aquaporina PIP2-7 e do translocador de fosfato foram superexpressos no genótipos resistente (Tabela 4).

Os transportadores de magnésio CorA são mediadores do influxo de magnésio em bactérias que possuem correlatos em arabidopsis. Tais transportadores são capazes de transportar outros cátions bivalentes, são altamente sensíveis à inibição por alumínio e alguns deles estão localizados na membrana plasmática (LI et al., 2001). As importinas ou carioferinas estão envolvidas no importe de proteínas marcadas com um sinal de localização nuclear. SAD2, uma importina beta de arabidopsis, está envolvida na sinalização por ABA (VERSLUES et al., 2006). ABA é necessário para a suscetibilidade a *Botrytis cyreneae* e por inibir a resposta de defesa mediada por SA em

tomate (AUDENAERT et al., 2002). Apesar de algumas especulações, a verdadeira relação entre a ativação destes transportadores e a resposta a patógenos é desconhecida.

A proteína BN59 de *Brassica napus* é homóloga à subunidade de 70 kDa da ATPase H(+)- vacuolar de plantas. O acúmulo desta proteína vacuolar ocorre durante ajuste osmótico, aumento nas concentrações endógenas de ABA e proliferação de endomembranas durante a aclimação ao frio (ORR et al., 1995). Em uma célula madura, o vacúolo é o maior compartimento intracelular, ocupando cerca de 90% do volume celular. O gradiente eletroquímico de prótons (ácido dentro) formado pela ATPase vacuolar proporciona a força primária para o transporte de inúmeros íons e metabólitos contra gradiente eletroquímico. O influxo e efluxo de solutos através da membrana vacuolar é fundamental para muitos processos celulares, tais como osmorregulação, transdução de sinal e regulação metabólica (SZE et al., 1992). A bomba de prótons ancorada à membrana vacuolar energizada por pirofosfato, tem o mesmo papel da ATPase H(+)-. Entretanto, sua capacidade é igual e às vezes maior que a da ATPase (SARAFIAN et al., 1992).

As aquaporinas são canais transmembrana que permitem o movimento de água através de membranas celulares. Estas proteínas são rapidamente ativadas em plantas sob estresse de seca ou alta salinidade. Em células sinciciais de raízes de soja infectadas com nematóide do cisto, foi detectada a expressão da aquaporina PIP2,2 (KLINK et al., 2005). Apesar da reconhecida importância desta proteína na defesa da planta contra o estresse hídrico, o papel que ela pode desempenhar na defesa de plantas a patógenos é ainda incerto.

A expressão precocemente aumentada do translocador de fosfato mitocondrial 1, uma proteína da membrana mitocondrial interna que importa fosfato inorgânico para síntese de ATP, foi identificada em plantas de bétula após exposição a ozônio, *Pseudomonas syringae* e peróxido de hidrogênio. O aumento precoce da expressão deste gene pode ser controlado pelas cascatas de sinalização relacionadas ao transporte de elétrons e síntese de ATP na mitocôndria, que regulam a homeostase redox e energética. Foi visto alterações estruturais na mitocôndria logo após a produção

de peróxido de hidrogênio apoplástico em bétula, o que poderia representar parte destas respostas (PELLINEN et al., 2002).

### Senescência

Uma suposta proteína de senescência foi superexpressa no genótipo suscetível (Tabela 4). A defesa de plantas e a senescência compartilham muitas similaridades, conforme evidenciado pela extensiva co-regulação de muitos genes durante estas respostas. A proteína SEN1 associada a senescência foi induzida em arábida por inoculações com patógenos e tratamento com SA e MeJA (SCHENK et al. 2005). Se a proteína de senescência é ativada como um resultado do estabelecimento da interação compatível ou desempenha um papel neste processo, ainda não foi esclarecido.

### Outras Rotas Metabólicas

Quatro proteínas ribossomais foram superexpressas no genótipo suscetível, enquanto uma diferente foi subexpressa no genótipo resistente (Tabela 4). Não foi encontrada na literatura alguma relação entre a subexpressão ou a superexpressão de proteínas ribossomais e a defesa de plantas contra patógenos. Entretanto, foi demonstrada a indução de proteínas ribossomais durante a senescência foliar (QUIRINO et al., 1999), a qual é uma das características da resposta à ferrugem em genótipos suscetíveis.

Foram superexpressos no genótipo suscetível similares da proteína de ligação à clorofila a/b e da rubisco ativase alfa 2 (Tabela 4). Não foi possível associar a mudança de expressão das proteínas envolvidas na fotossíntese e ciclo de Calvin e a resposta a fitopatógenos. Entretanto, a proteína de ligação à clorofila a/b já foi detectada em outros trabalhos como parte dos genes ativados na resposta da planta ao patógeno. Também foi superexpresso similar da 3-beta hidroxisteróide desidrogenase/isomerase (Tabela 4). Esta proteína cataliza a conversão de pregnenolona em progesterona. Não há descrição na literatura sobre a participação da mesma em resposta de plantas a fitopatógenos.

### Estratégia de Defesa Mediada pelo *Rpp2*

Sumarizando os resultados disponibilizados neste trabalho, é possível propor parte da estratégia de defesa mediada pelo *Rpp2*. Há uma explicação para o fato de transcritos que atuam nas mesmas rotas metabólicas serem expressos em ambos os genótipos, suscetível e resistente. Conforme o conhecimento acumulado nas experiências em outros patossistemas, muitos dos genes que são induzidos no genótipo resistente são também induzidos no genótipo suscetível, entretanto sob uma cinética diferente (WISE et al., 2007). As respostas de defesa associadas ao genótipo resistente são frequentemente mais rápidas que as do genótipo suscetível, graças à capacidade do primeiro de reconhecer prontamente o patógeno via a interação com as proteínas elicitoras. Apesar da ativação no decurso do tempo ser um importante componente das estratégias de defesa, ele não foi avaliado neste trabalho, e permanecerá como um objetivo para um trabalho futuro. Entretanto, MORTEL et al. (2007) trabalhando com os mesmos genótipos utilizados neste trabalho, sob a interação com a mesma raça fisiológica de *P. pachyrhizi* e avaliando oito períodos diferentes após a inoculação, puderam detectar picos de expressão gênica em momentos diferentes para o genótipos resistente e suscetível. A expressão de genes relacionados à defesa ocorreu primeiramente no genótipo resistente em relação ao suscetível.

A maioria dos transcritos, contudo, foi diferencialmente expressa num genótipo e não no outro, sugerindo a existência de uma diferença qualitativa e não somente temporal no padrão de expressão gênica entre o genótipo suscetível e resistente. Supõe-se que com o encontro entre as células da planta e do fungo, o produto do gene *Avr* do patógeno é recebido pelo produto do *Rpp2*. Este então ativa outras proteínas, iniciando a sinalização do estresse. Vários dos genes identificados na biblioteca subtrativa possuíam estrutura análoga a genes de resistência. Genes de resistência podem expressar-se tanto nos genótipos suscetíveis quanto nos resistentes, entretanto desencadear resposta no genótipo resistente, sem contudo fazê-lo no genótipo suscetível. Essa pode ter sido a causa de não ter sido revelado, entre os transcritos diferencialmente expressos na análise de microarranjos, algum candidato ao *Rpp2*.

O conhecimento do padrão de interação de outros genes de resistência pode orientar a descoberta do mecanismo de funcionamento do *Rpp2*. O produto do gene

*Rps2* de *Arabidopsis*, de resistência a *Pseudomonas syringae*, interage com a chaperona HSP90, a 4-cumarato-CoA ligase (4CL), uma proteína ribossomal e uma proteína com domínio anquirina/tetratricopetídio, entre outras proteínas. Além destas, a RAR1 e talvez a Sgt1a/b, proteínas de ligação à ubiquitina, também desempenham papéis significativos na mediação da função apropriada de RPS2, por mediar a localização ou renovação desta proteína (QUIRINO et al., 2004). Estes dados sugerem que alguns dos genes cuja expressão foi significativamente maior no genótipo resistente sejam parceiros de interação com produto do *Rpp2*.

Orientando-se nas informações relativas ao *Rps2*, é possível propor que a anquirina, uma vez ligada ao produto do *Rpp2*, ative outras proteínas, como as controladoras da expressão gênica, sinalizando a resposta de defesa. As proteínas controladoras da expressão gênica, supostamente como a RNA-helicase ATP-dependente, controlariam a expressão de outros genes envolvidos na resposta de defesa. A expressão de proteínas PR, como a serina protease e a germina, seria ativada. A serina protease atuaria extracelularmente sobre o fungo, liberando peptídeos elicitores, que intensificariam o sinal de defesa. A proteína similar a germina produziria peróxido de hidrogênio no apoplasto, reforçando a parede celular, criando um ambiente tóxico ao patógeno e também amplificando o sinal de defesa. Por outro lado, o produto do *Rpp2* também poderia se ligar a outras proteínas, como a 4CL, a chaperonina similar a GroEL, proteínas ribossomais e proteínas de ligação a ubiquitina. A 4CL, juntamente com a HCBT, desencadearia a síntese de fitoalexinas, atuando negativamente sobre o fungo. A inibição das chaperonina GroEL levaria à morte celular, aliada à inativação da proteína Scythe e à ativação do EF1- $\alpha$ . As proteínas de ligação a ubiquitina promoveriam a renovação do produto do *Rpp2* e/ou induziriam a degradação de outras proteínas, dando continuidade ao processo de morte celular (Figura 6). Vale ressaltar que estas são apenas hipóteses que necessitam de exaustivos estudos adicionais para serem comprovadas.

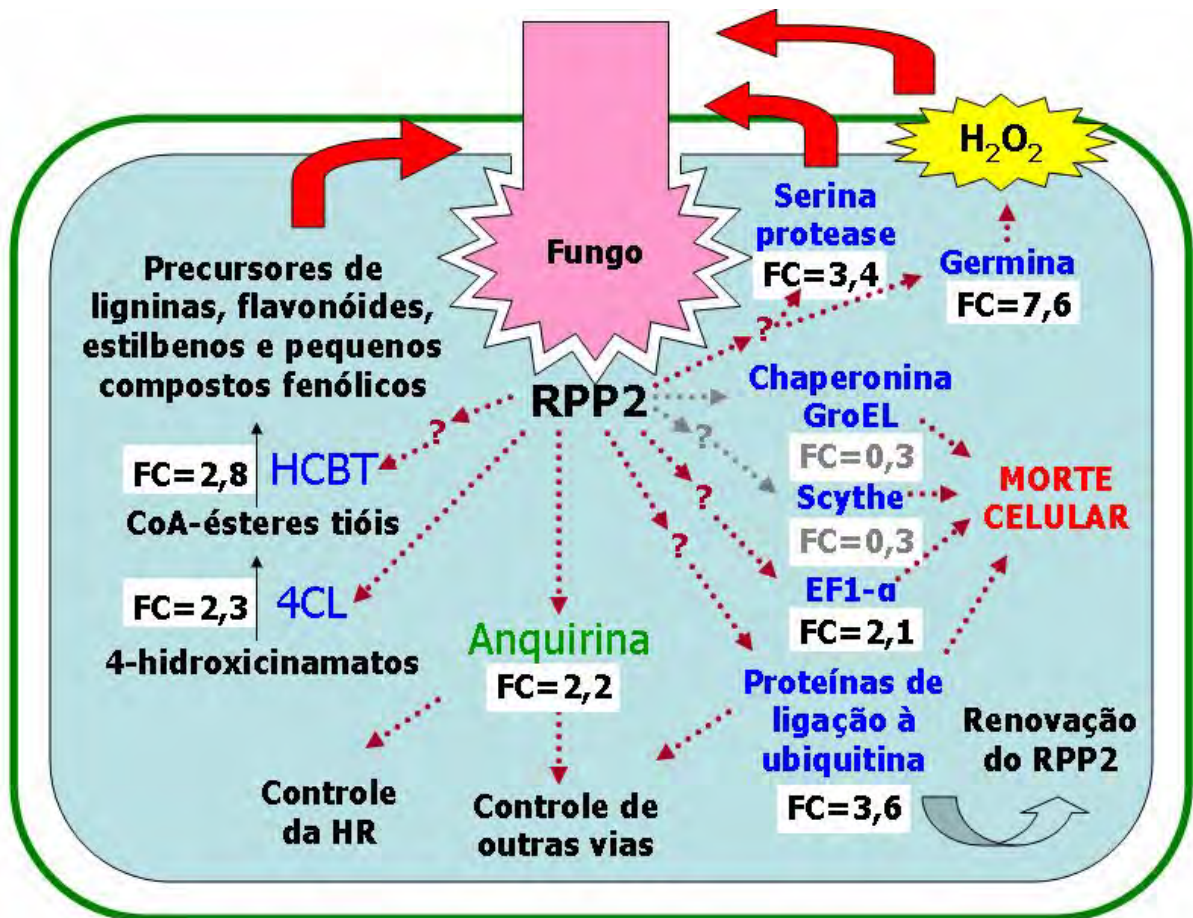


Figura 6: Potencial estratégia de defesa mediada pelo gene *Rpp2*. O produto do gene *Rpp2* ativaria direta ou indiretamente: a anquirina, a qual pode ligar-se a transportadores de açúcar e fatores de transcrição, controlando a HR e interferindo em outras vias metabólicas; a 4CL, a qual juntamente com a HCBT, desencadearia a síntese de fitoalexinas; proteínas de ligação a ubiquitina e o EF1- $\alpha$ , induzindo a morte celular, renovando o produto do *Rpp2* e, possivelmente, degradando fatores de transcrição, controlando outras vias metabólicas; a proteína similar a germina, criando um ambiente tóxico ao patógeno; a serina protease, liberando extracelularmente peptídios elicitores, que intensificariam o sinal de defesa. O produto do gene *Rpp2* também inativaria direta ou indiretamente a proteína Scythe e a chaperonina similar a GroEL, contribuindo para a ocorrência da morte celular. FC: "fold change"

Algumas proteínas reveladas neste trabalho como associadas à defesa mediada pelo *Rpp2* merecem destaque. A chaperonina GroEL certamente tem um papel

importante na defesa, uma vez que sua expressão foi induzida no genótipo suscetível e reprimida no resistente, o que indica uma atividade antagônica entre os genótipos contrastantes. Como sua atividade está relacionada à morte celular, esta proteína pode ser controladora da HR. Estes fatos justificam estudos posteriores focados somente nesta proteína. A anquirina, em função de seu suposto papel central na sinalização de defesa, é uma proteína que possui potencial de emprego no melhoramento de linhagens para a resistência a ferrugem e deve ser estudada com maior profundidade. A suposta participação da proteína Scythe e do EF1- $\alpha$  na ativação da HR também merecem ser investigados.

O presente trabalho disponibilizou a seqüência de inúmeros transcritos ativados em soja em resposta à ferrugem asiática e revelou parte das rotas metabólicas potencialmente ativadas durante as interações compatível e incompatível. Ainda, demonstrou a ativação de genes nos genótipos suscetíveis e resistentes decorrente da interação com a ferrugem asiática, que não haviam sido previamente associados a respostas de defesa. A contribuição deste trabalho para o enriquecimento do conhecimento da reação da soja à ferrugem é de grande importância.

### **Referências Bibliográficas**

AUDENAERT, K.; DE MEYER, G. B.; HÖFTE, M. M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. **Plant Physiology**, Washington, v. 128, n. 2, p. 491-501, Feb. 2002.

BENTEM, S. F. DE LA FUENTE, V. B. S.; VOSSEN, J. H.; DE VRIES, K. J.; VAN WEES, S.; TAMELING, W. I.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; HARING, M. A.; TAKKEN, F. L.; CORNELISSEN, B. J. Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. **Plant Journal**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 284–298, 2005.

BONDE, M. R.; BROWN, M. F. Morphological comparison of isolates of *Phakopsora pachyrhizi* from different areas of the world. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 26, n. 12, p. 1443-1449, Dec.1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Serviço Nacional de Proteção de Cultivares**: certificados de proteção concedidos no período de 01/01/1998 a 07/11/2007. Brasília: MAPA, 2007. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/lst1200\\_07\\_11\\_2007.htm](http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/lst1200_07_11_2007.htm)>. Acesso em: 1º mar. 2007.

BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 254-255, Mar.-Apr. 1980.

CAMPANELLA, J. J.; OLAJIDE, A. F.; MAGNUS, V.; LUDWIG-MÜLLER, J. A Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat with Substrate Specificity for Longer Side-Chain Auxin Amide Conjugate. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, n. 4, p. 2230-2240, 2004.

CAZALÉ, A.-C. ROUET-MAYER, M.-A.; BARBIER-BRYGOO, H.; MATHIEU, Y.; LAURIÈRE, C. OXIDATIVE BURST AND HYPOOSMOTIC STRESS IN TOBACCO CELL SUSPENSIONS. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, n. 2, p. 659-669, Feb. 1998.

CHENG, Y. W.; CHAN, K. L. The breeding of 'Tainung 3' soybean. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, Taiwan, v. 17, p. 30-35, 1968.

CHU, G.; NARASIMHAN, B; TIBSHIRANI, R.; TUSHER, V. **SAM**: "Significance Analysis of Microarrays": Users guide and technical document. 2001. Disponível em <<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/sam.pdf>>. Acesso em 03 Dez. 2007.

CLEVELAND, W. S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. **Journal of American Statistical Association**, New York, v. 74, p.829-836, 1979.

CONAB. **Indicadores da agropecuária**: outubro de 2007. Brasília: CONAB/DIGEM/SUINF/GEINT, Ano XVI, n. 10., 2007. 64 p.

DESMOTS, F.; RUSSELL, H. R.; MICHEL, D.; MCKINNON, P. J. Scythe regulates apoptosis inducing factor stability during endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Dec. 2007. Epub ahead of print. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M706419200>>. Acesso em 20 Dez. 2007.

DONG, W.; NOWARA, D.; SCHWEIZER, P. Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 11, p. 3321-3331, Nov. 2006.

EBBOLE, D. J. *Magnaporthe* as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p.437-56, Sep. 2007.

ELLIOTT, B. J.; DATTAROY, T.; MEEKS-MIDKIFF, L.R.; FORBES, K.P.; HUNT, A.G. An interaction between an *Arabidopsis* poly(A) polymerase and a homologue of the 100 kDa subunit of CPSF. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 373-384, Feb. 2003.

ELLIS, J. G.; DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 289-306, Sep. 2007.

EHLTING, J.; SHIN, J. J. K., DOUGLAS, C. J. Identification of 4-coumarate CoA ligase (4CL) substrate recognition domains. **Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 455-465, 2001.

ERPELDING, J.; MARTIN, J.; GAI, X.; DANTE, M.; BRENDDEL, V.; WYLIE, T.; RAPH-SCHMIDT, C.; GRANGER, C.; SHOOP, E.G.; VIELWEBER, C.J.; SCHMATZ, M.; PAPE, D.; BOWERS, Y.; THEISING, B.; SHOEMAKER, R.; KEIM, P.; VODKIN,

L.; RETZEL, E.; CLIFTON, S.W.; WATERSTON, R.; SMOLLER, D.; CORYELL, V.; KHANNA, A. A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. **Genome**, Ottawa, v. 45, p. 329-38, 2002.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p.186-194, Mar. 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, Mar. 1998.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**: Special Report 80. Ames: ISU, 1977.

FLOR, H. H. Current status of gene-a-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, Sep. 1971.

GODFREY, D.; ABLE, A. J.; DRY, I. B. Induction of grapevine germin-like protein (*VvGLP3*) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 9, p. 1112-1125, Sep 2007.

GRENVILLE-BRIGGS, L. J. AVROVA, A. O.; BRUCE, C. R.; WILLIAMS, A.; WHISSON, S. C.; BIRCH, P. R.; VAN WEST, P. Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, n. 3, p. 244-256, Mar. 2005.

GUCCIARDO, S. WISNIEWSKI, J.-P.; BREWIN, N. J.; BORNEMANN, S. A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadesin receptor. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 1161-1171, Jan. 2007.

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

HAHN, M.; MENDGEN, K. Characterization of in planta induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, p. 427-437, 1997.

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

HIDAYAT, O. O.; SOMAATMADJA, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, v. 1, p. 9-22, 1977.

HUANG, G. ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 14302-14306, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, Sep. 1999.

HUANG, Y. LI, HUI; HUTCHISON, C. E.; LASKEY, J.; KIEBER, J. J. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 221-233, Jan. 2003.

HÜCKELHOVEN, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 101-127, Sep. 2007.

HYTEN, D. L.; HARTMAN, G. L.; NELSON, R. L.; FREDERICK, R. D.; CONCIBIDO, V. C.; NARVEL, J. M.; CREGAN, P. B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, Madison, 47, p. 837-838, Mar.-Apr. 2007.

ISHIKAWA, A.; ANAKA, H.; NAKAI, M.; ASAH, T. Deletion of a Chaperonin 60\_ Gene Leads to Cell Death in the Arabidopsis *lesion initiation 1* Mutant. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, n. 3, p. 255-261, 2003.

JAYARAJ, J.; ANAND, A.; MUTHUKRISHNAN, S. Pathogenesis related proteins and their roles in resistance to fungal pathogens. I: PUNJA, Z. K. (Ed.). **Fungal disease resistance in plants: biochemistry, molecular biology and genetic engineering**. Binghamton: Haworth, 2004. p. 139-178.

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

KEMEN, E.; KEMEN, A. C.; RAFIQI, M.; HEMPEL, U.; MENDGEN, K.; HAHN, M.; VOEGELE, R. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 18, n. 11, 1130-1130, Nov. 2005.

KLINK, V. P. ALKHAROUF, N.; MACDONALD, M.; MATTHEWS, B. Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of *Glycine max* (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 6, p. 965-979, Dec. 2005.

KLINK, V. P. OVERALL, C. C.; ALKHAROUF, N. W.; MACDONALD, M.; MATTHEWS, B. Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression

analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Planta**, Berlin, v. 226, n. 6, p. 1389-1409, Nov. 2007.

KOO, A. J. CHUNG, H. S.; KOBAYASHI, Y.; HOWE, G. A. Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 44, p. 33511-33520, Nov. 2006.

LAHAYE, T.; BONAS, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, p. 479-485, 2001.

LANGE, J.; XIE, Z.-P.; BROUGHTON, W.J.; VOGELI-LANGE, R.; BOLLER, T. A gene encoding a receptor-like protein kinase in the roots of common bean is differentially regulated in response to pathogens, symbionts and nodulation factors. **Plant Science**, Limerick, v. 142, p. 133-145, 1999.

LI, L.; TUTONE, A. F.; DRUMMOND, R. S. M.; GARDNER, R. C.; LUAN, S. A novel family of magnesium transport genes in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 12, p. 2761-2775, Dec. 2001.

LIER, S.; PAULULAT, A. The proteasome regulatory particle subunit Rpn6 is required for Drosophila development and interacts physically with signalosome subunit Alien/CSN2. **Gene**, Amsterdam, v. 298, n. 2, p. 109-119, Oct. 2002.

LU, H.; RATE, D. N.; SONG, J. T.; GREENBERG, J. T. ACD6, a novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the Arabidopsis defense response. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 10, p. 2408-2420, Oct. 2003.

MANNA, S.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, S.; DAS, S.; PANDA, C. Epigallocatechin gallate induced apoptosis in Sarcoma180 cells in vivo: mediated by p53 pathway and

inhibition in U1B, U4-U6 UsnRNAs expression. **Apoptosis**, v. 11, n. 12, p. 2267-2276, Dec. 2006.

MCLEAN, R. J. Histological studies of resistance to soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 30, n. 1, p. 77-84, Feb. 1979.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Histological studies of the pre-penetration development and penetration of soybeans by rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 32, n. 3, p. 435-443, June 1981.

MENDGEN, K.; KRIEG, P. A.; REBAGLIATI, M. R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M. R. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 6, p. 1353-1361, Nov. 2006.

MILES, M. R.; FREDERICK, R. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Health Progress** On line, Jan. 2006. doi:10.1094/PHP-2006-0104-01-RS. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/germplasm/>>. Acesso 20 Dez. 2007.

MINAMI, R.; SHIMADA, M.; YOKOSAWA, H.; KAWAHARA, H. Scythe regulates apoptosis through modulating ubiquitin-mediated proteolysis of the *Xenopus* elongation factor XEF1AO. **Biochemical Journal**, London, v. 405, n. 3, p. 495-501, Aug. 2007.

MONTEROS, M. J.; MISSAOUI, A. M.; PHILLIPS, D. V.; WALKER, D. R.; BOERMA, H. R. Mapping and Confirmation of the 'Huyuuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. **Crop Science**, Madison, 47, p. 829-834, Mar.-Apr. 2007.

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**, Washington, v. 133, n. 2, p. 773-782, Oct. 2003.

MORTEL, M. V. D.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J. D.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian Soybean Rust Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 8, p. 887–899, Aug. 2007.

NUNTAPUNT, M.; SRISOMBUN, S.; CHUNWONGSE, J. Soybean breeding for rust resistance in Thailand and extent of rust resistant cultivars used. In: World Soybean Research Conference, 7., 2004, Iguasu Falls. **Abstracts...** Iguasu Falls: Embrapa, 2004, p. 423-430.

ORR, W.; WHITE, T. C.; IU<sup>1</sup>, B.; ROBERT, L.; SINGH, J. Characterization of a low-temperature-induced cDNA from winter *Brassica napus* encoding the 70 kDa subunit of tonoplast ATPase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 943-948, Aug. 1995.

PANTHEE, D. R.; YUAN, J. S.; WRIGHT, D. L.; MAROIS, J. J.; MAILHOT, D.; STEWART, J. R. C.N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional Integrative Genomics**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 291-301, Oct. 2007.

PECK, S. C.; NÜHSE, T. S.; HESS, D.; IGLESIAS, A.; MEINS, F.; BOLLER, T. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1467-1475, 2001.

PELLINEN, R. I.; KORHONEN, M.-S.; TAURIAINEN, A. A.; PALVA, E. T.; KANGASJÄRVI, J. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 2, p. 549-560, Oct. 2002.

POSADA-BUITRAGO, M. L.; FREDERICK, R. D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 949–962, 2005.

PUIG, O.; BRAGADO-NILSSON, E.; KOSKI, T.; SÉRAPHIN, B. The U1 snRNP-associated factor Luc7p affects 5' splice site selection in yeast and human. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. 17, p. 5874-5885, 2007.

QUACKENBUSH, J. Microarray data normalization and transformation. **Nature Genetics Supplement**, London, v.32, p.496-501, Dez. 2002.

QUIRINO, B. F., NORMANLY, J.; AMASINO, R. M. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 267-278, May 1999.

QUIRINO, B. F.; GENGER, R.; HAM, J. H.; ZABALA, G.; BENT, A. F. Identification and functional analysis of *Arabidopsis* proteins that interact with resistance gene product RPS2 in yeast. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n. 5, p. 257-267, 2004.

RIVAS, S.; THOMAS, C. M. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 395–436, Sep 2005.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H.-Y.; HUNT, M. D., Systemic Acquired Resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, 1809-1819, Oct. 1996.

SARAFIAN, V. KIM, Y.; POOLE, R. J.; REA, P. A. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of

*Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 5, p. 1775-1779, Mar. 1992.

SCHENK, P. M. KAZAN, K.; RUSU, A. G. G.; MANNERS, J. M. M.; MACLEAN, D. J. J. The SEN1 gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 10-11, p. 997-1005, Nov.-Dec. 2005.

SCHNEIDER, K.T.; MORTEL, M. V. D.; NETTLETON, D.; FREDERICK, R. D.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Microarray analysis of *Rpp3*-mediated resistance to soybean rust infection. In: National Soybean Rust Symposium, 2., 2006, St. Louis. **Proceedings...** Saint Louis: PMN, 2006.

SCHNEIDER, R. W., HOLIER, C. A.; WHITHAM, H. K.; PLAM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNANDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 774, July 2005.

SHARMA, N.; PARK, S.-W.; VEPACHEDU, R.; BARBIERI, L.; CIANI, M.; STIRPE, F.; SAVARY, B. J.; VIVANCO, J. M. Isolation and Characterization of an RIP (Ribosome-Inactivating Protein)-Like Protein from Tobacco with Dual Enzymatic Activity. **Plant Physiology**, Paris, v. 134, n. 1, p. 171-181, Jan. 2004.

SINGH, B. N. et al. A pea chloroplast translation elongation factor that is regulated by abiotic factors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 2, p. 523-530, July 2004.

SONG, W.-Y.; WANG, G.-L.; CHEN, L.-L.; KIM, H.-S.; PI, L.-Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W.-X.; ZHU, L.-H.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **Science**, Washington, v. 270, p. 1804-1806, 1995.

SOUZA, J. A. M. **Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* semia 587 “in vitro” e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de DNA.** 2006. 152 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SZE, H.; WARD, J. M.; LAI, S. Vacuolar H(+)-translocating ATPases from plants: structure, function, and isoforms. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 24, n. 4, p. 371-381, Aug. 1992.

TIAN, M.; HUITEMA, E.; CUNHA, L.; TORTO-ALALIBO, T.; KAMOUN, S. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 26370-26377, 2004.

TIAN, M.; WIN, J.; SONG, J.; VAN DER HOORN, R.; VAN DER KNAAP, E.; KAMOUN, S. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. **Plant Physiology**, Washington, v. 143, n. 1, p. 364-377, Jan. 2007

TOKUMOTO, T.; KONDO, A.; MIWA, J.; HORIGUCHI, R.; TOKUMOTO, M.; NAGAHAMA, Y.; OKIDA, N.; ISHIKAWA, K. Regulated interaction between polypeptide chain elongation factor-1 complex with the 26S proteasome during *Xenopus* oocyte maturation. **BioMed Central Biochemistry**, v. 4, p. 6-15, Jul 2003.

TUSHER, V.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 9, p. 5116-5121, Apr. 2001.

VERSLUES, P. E.; GUO, Y.; DONG, C. H.; MA, W.; ZHU, J. K. Mutation of SAD2, an importin beta-domain protein in *Arabidopsis*, alters abscisic acid sensitivity. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 776-787, Sep. 2006.

VOEGELE, R. T. *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 259, n. 2, p. 165-173, Jun. 2006.

WANG, D.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; CULLER, A. H.; DONG, X. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. **Current Biology**, London, v. 17, n. 20, p. 1784-1790, Oct. 2007.

WANG, Y.; CAO, Y.-Y.; JIA, X.-M.; CAO, Y.-B.; GAO, P.-H.; FU, X.-P.; YING, K.; CHEN, W.-S.; JIANG, Y.-Y. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 40, n. 7, p. 1201-1209, Apr. 2006.

WAY, H. M.; KAZAN, K.; GOULTER, K.; BIRCH, R. G.; MANNERS, J. M. Expression of the Shpx2 peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 4, p. 223-232, 2000.

WELSH, R.; MAAB, D.; VOEGEL, T.; DELLAPENNA, D.; BEYER, P. Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 145, n. 3, p. 1073-1085, Nov. 2007.

WIRDNAM, C.; MOTOYAMA, A.; ARN-BOULDOIRES, E.; EEDEN, S. VAN; IGLESIAS, A.; MEINS, F. JR. Altered expression of an ankyrin-repeat protein results in leaf abnormalities, necrotic lesions, and the elaboration of a systemic signal. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 5, p. 717-730, 2004.

WISE, R. P.; MOSCOU, M.; BOGDANOVA, A. J.; WHITHAM, S. A. Transcript profiling in host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 329-369, Sep. 2007.

- XIE, C.; ZHANG, J.-S.; ZHOU, H.-L.; LI, J.; ZHANG, Z.-G.; WANG, D.-W.; CHEN, S.-Y. Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 385-393, Jan. 2003.
- XIE, Q. GUO, H.-S.; DALLMAN, G.; FANG, S.; WEISSMAN, A. M.; CHUA, N.-H. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. **Nature**, London, v. 419, p. 167–170, 2002.
- YAN, J.; WANG, J.; ZHANG, H. An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. **Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 193-202, 2002.
- YANG, Q.; REINHARD, K.; SCHILTZ, E.; MATERN, U. Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/ benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 6, p. 777-789, Dez 1997.
- YANG, Q.; GRIMMING, B.; MATERN, U. Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/ benzoyltransferase gene from carnation: rapid elicitation of transcription and promoter analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, n. 6, p. 1201-1214, 1998.

## CAPÍTULO 4 - IMPLICAÇÕES

A ferrugem asiática da soja constitui atualmente a principal fonte de perdas econômicas para o agronegócio da soja brasileira, seja devido a perdas de produção ou ao investimento em defensivos químicos. A principal estratégia para combate de doenças em culturas vegetais - a utilização de variedades resistentes e/ou tolerantes - não foi explorada até o momento para o controle desta doença no Brasil. O objetivo do presente trabalho foi acessar informações moleculares da soja ao nível do genoma e transcrito, a fim de acelerar a obtenção de variedades resistentes à ferrugem asiática.

Nesse trabalho foram encontrados marcadores SSR ligados a dois genes de resistência ainda efetivos à ferrugem asiática no Brasil, *Rpp2* e *Rpp4*. Utilizando as informações de localização genômica de tais marcadores, foi possível mapear estes genes nos grupos de ligação J e G da soja, respectivamente. Os dados produzidos neste trabalho possibilitarão o desenvolvimento de marcas mais próximas a estes genes, as quais poderão ser utilizadas na seleção assistida por marcadores moleculares para o acúmulo destes genes em cultivares elite de soja. Quando diferentes locos codificam para o mesmo fenótipo, a utilização de marcadores moleculares possibilita a fácil identificação dos indivíduos portadores de mais do que um loco, facilitando assim o acúmulo destes em cultivares.

A piramidação de genes de resistência é uma das alternativas que podem ser utilizadas pelos melhoristas para aumentar a durabilidade da resistência monogênica. A resistência monogênica raça-específica, como a conferida pelos genes *Rpp*, é conhecida por ser rapidamente perdida, em virtude da seleção de novas raças virulentas do patógeno. A piramidação pode retardar o processo de coevolução do patógeno, porque a resistência conferida pelos diferentes genes *R* piramidados somente seria quebrada caso fossem selecionados mutantes virulentos para cada gene *Avr* correspondente em uma única linhagem do patógeno.

Outras alternativas viáveis para o aumento da durabilidade da resistência monogênica são o plantio misto de multilinhas e a rotações de variedades, portando

cada uma delas contendo um gene de resistência diferente. Estas estratégias teoricamente diminuem a pressão de seleção de 'super-raças' virulentas na população do patógeno. Se uma destas alternativas for a escolha do melhorista, os marcadores moleculares ligados aos genes de resistência poderão ser úteis no processo de seleção de linhagens durante a transferência dos alelos de resistência a cultivares elite. A seleção assistida por marcadores, além de menos laboriosa, elimina o efeito ambiental, o qual muitas vezes mascara o fenótipo e diminui a eficiência da seleção. Além disso, utilizando marcadores estreitamente ligados aos genes de resistência, pode se evitar a transferência de outras características indesejáveis ligadas cromossomicamente ao caráter.

Outra estratégia para aumentar a durabilidade da resistência monogênica (vertical) é a combinação da mesma com a resistência poligênica (horizontal), ou tolerância. Deste modo, se a resistência monogênica for quebrada, a cultivar ainda poderá manter sua produtividade em níveis elevados. A seleção assistida por marcadores também pode facilitar esta combinação. Apesar da grande preocupação com o uso da resistência monogênica em programas de melhoramento, existem exemplos que comprovam que sua efetividade nem sempre é efêmera. A resistência mediada pelo gene *Cf-9* de tomate contra o fungo *Cladosporium fulvum* tem se mantido efetiva desde o início dos anos 80 do século anterior (cerca de 25 anos). O motivo porque alguns genes *R* proporcionam uma resistência mais durável do que outros, ainda não foi esclarecido (HAMMOND-KOSAK & JONES et al., 2000, referência disponível no Capítulo 1).

O desenvolvimento de marcas mais próximas aos genes de resistência tem sido facilitado nos últimos anos com a crescente gama de marcadores moleculares que tem sido disponibilizados para pesquisa. Os SNPs (Polimorfismos de um Único Nucleotídeo) apresentam a grande vantagem do seu polimorfismo ilimitado. Recentemente, um grande número de SNPs foram mapeados nos grupos de ligação da soja e disponibilizados para pesquisa. Graças às plataformas de genotipagem de indivíduos baseadas em SNPs, tornou-se possível o aproveitamento do imenso potencial de polimorfismo de tais marcadores. Estima-se que nos próximos anos a análise de SNPs

seja a principal estratégia de genotipagem individual aplicada à medicina e agropecuária moleculares.

Recentemente, foram desenvolvidos novos marcadores SSR na Universidade Estadual de Iowa para o grupo de ligação J, na região genômica compreendida entre os marcadores Satt620 e Sat\_255, o quais flanqueiam o *Rpp2*. Estes marcadores estão sendo utilizados no momento pelo grupo de pesquisa que conduziu o presente trabalho para saturar o grupo de ligação J. Marcadores AFLP também serão em breve utilizados para a saturação dos grupos de ligação J e G nas regiões de localização do *Rpp2* e *Rpp4*. Além disso, pesquisadores da Universidade Estadual de Iowa estão colaborando na clonagem baseada em mapeamento dos genes *Rpp2* e *Rpp4*. Os marcadores que flanqueiam cada gene foram usados para identificar agrupamentos de clones BAC que podem conter os referidos genes de resistência.

Foram produzidas neste trabalho quatro bibliotecas subtrativas de cDNA da soja em resposta a ferrugem asiática, gerando um total de 3.807 seqüências viáveis, que representam 670 seqüências únicas. A expressão diferencial dos transcritos identificados foi avaliada através de análise de microarranjos de cDNA. Assim, foi possível identificar genes da soja que apresentam resposta à ferrugem asiática e desenvolver idéias sobre a estratégia de defesa mediada pelo gene *Rpp2*. No total foram sequenciados 4.704 clones no total das quatro bibliotecas e o seqüenciamento de clones adicionais poderia gerar informação nova principalmente para as bibliotecas E192 e P024, para as quais foram obtidos os mais baixos índices de redundância. Recentemente, foram sequenciados 96 clones adicionais para cada uma das quatro bibliotecas na unidade de seqüenciamento da Universidade Estadual de Iowa. Estas seqüências serão em breve adicionadas às análises apresentadas neste trabalho, enriquecendo um pouco mais o conjunto de seqüências da soja que respondem à ferrugem asiática.

Algumas das conclusões apresentadas foram limitadas pela falta de informação sobre a expressão dos genes estudados no período anterior a 24 horas e entre 24 e 192 horas. Foram esgotadas cerca de 15 lâminas de microarranjos sobressalentes, as quais poderão ser utilizadas para um estudo mais amplo do padrão temporal de expressão das seqüências identificadas.

Os dados de seqüência gerados poderão ser desdobrados na realização de inúmeros outros projetos. Alguns dos genes identificados nas bibliotecas podem ser candidatos ao gene *Rpp2*, em função de sua estrutura análoga a genes *R*, apesar de tais genes não terem apresentado aumento significativo de expressão gênica no genótipo resistente. Será possível desvendar o suposto envolvimento destes genes na resistência mediante teste de co-segregação de marcadores ligados a eles com o fenótipo de resistência na população de mapeamento do *Rpp2*.

As seqüências do fungo produzidas poderão ser empregadas em sistemas de expressão para o estudo de seu potencial como moléculas elicitoras. Tais transcritos podem ser indispensáveis para o fungo durante o processo infeccioso. Se assim forem, eles poderiam ser empregados no melhoramento transgênico da soja utilizando a tecnologia de interferência por RNA, a exemplo do trabalho desenvolvido por Huang e colaboradores (2006; referência no Capítulo 3), que produziram uma linhagem transgênica de arabisopsis expressando um RNA de interferência homólogo a proteínas de parasitismo do nematóide causador da podridão da raiz. Mediante esta estratégia, eles obtiveram nesta linhagem resistência a quatro espécies diferentes deste nematóide, algo que não ocorre com nenhum alelo ou poligene naturalmente resistente à podridão da raiz. Estas possibilidades tornam indispensável o estudo do papel destas seqüências na interação entre soja e ferrugem. O papel de transcritos como a proteína Scythe, o EF1- $\alpha$ , a chaperonina similar a GroEL e a anquirina na resistência, também deve ser explorado. Tais seqüências podem demonstrar potencial para aplicação na produção de variedades transgênicas para a resistência à ferrugem asiática.

Conforme o exposto, o presente trabalho produziu informações genômicas e transcritômicas da soja importantes para a compreensão da resposta à ferrugem asiática. Entretanto, ele não representa a conclusão de um projeto de pesquisa, mas o início de vários outros projetos, os quais certamente enriquecerão o conhecimento atual das bases moleculares da interação entre soja e ferrugem asiática, e contribuirão para o controle desta doença no Brasil.

## APÊNDICE

Tabela 1: Seqüências identificadas no conjunto das bibliotecas E024, E192, P024 e P192 que encontraram similares de espécies de plantas no GenBank. São apresentados a suposta atividade ou função molecular da seqüência, a(s) biblioteca(s) em que a seqüência foi identificada, o nome do similar (conforme descrição no GenBank), seu código de acesso no GenBank, a espécie à qual o similar pertence, o algoritmo utilizado na descoberta do similar e o valor do “fold change” (FC) obtido na análise de microarranjos de cDNA.

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Biogênese de parede celular	E024	Glicosiltransferase	<i>Glycine max</i>	CAM31955	9E-87	BLASTX
	E024	Precursor da pectinacetilsterase	<i>Vigna radiata</i>	CAA67728	2E-53	BLASTX
	P024	Glicoproteína rica em hidroxiprolina	<i>Glycine max</i>	L22030	1E-134	BLASTN
	P192	Proteína da parede celular rica em prolina	<i>Glycine max</i>	J05209	1E-135	BLASTN
	P192	Pectinacetilsterase	<i>Eucalyptus globulus</i>	ABG34282	5E-37	BLASTX
Biogênese de citoesqueleto	E024	Peroxidase 2	<i>Medicago sativa</i>	CAA62228	2E-30	BLASTX
	E192, P192	Proteína desconhecida similar à extensina	<i>Glycine max</i>	AAF03043	3E-14	BLASTX
	E024	Actina	<i>Setaria italica</i>	AAG10041	4E-16	BLASTX
Biogênese de plastídios	P192	Proteína hipotética OsJ_017784	<i>Oryza sativa</i>	EAZ34301	3E-37	BLASTX
	E024	GC1 (cloroplasto gigante 1); catalítico/ligação a coenzima	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_565505	5E-64	BLASTX
	P192	Proteína de desenvolvimento de plastídio DAG, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_180901	1E-12	BLASTX
Biogênese de membrana plasmática	E024	Suposta UDP-glucuronato descarboxilase 3	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAT40109	1E-62	BLASTX
	E024	Suposta UDP-glucuronato descarboxilase 4	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAT40110	2E-9	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Organização da estrutura cromossômica	E024	Histona H2B	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAF81889	2E-35	BLASTX
	P192	Histona desacetilase 5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_200914	9E-20	BLASTX
Ciclo celular	E024	Suposta proteína do cinetócoro	<i>Vicia faba</i>	CAB87834	9E-14	BLASTX
	E024	Ciclina-T1-4	<i>Oryza sativa</i>	Q2QQS5	5E-18	BLASTX
	E024	mRNA da ciclina H	<i>Glycine max</i>	AY439093	2E-51	BLASTN
	E024	Proteína UVB-resistente 8	<i>Brassica rapa</i>	ABV89648	1E-33	BLASTX
Biossíntese de polissacarídeos	E024	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAN62061	2E-25	BLASTX
	E192, P192	Similar a adenosil-homocisteinase	<i>Oryza sativa</i>	AAO72664	1E-124	BLASTX
Metabolismo de aminoácidos	E024	Acetohidroxiácido sintase	<i>Gossypium hirsutum</i>	CAA87083	3E-73	BLASTX
	P192	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAO62917	5E-50	BLASTX
	E024	Família semialdeído desidrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_172934	2E-39	BLASTX
	E024	Serina hidroximetiltransferase, precursor mitocondrial (SHMT)	<i>Pisum sativum</i>	P34899	8E-44	BLASTX
	P192	Asparagina sintetase	<i>Glycine max</i>	AAC09952	3E-27	BLASTX
	P192	Glutamina sintetase GSbeta1 citosólica	<i>Glycine max</i>	AAG24873	1E-111	BLASTX
P192	Histidinol desidrogenase, precursor do cloroplasto (HDH)	<i>Brassica oleracea</i>	P24226	5E-33	BLASTX	

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo	
Metabolismo de aminoácidos	E024	IPMS1/MAML-4 (similar a metiltoalquilmalato sintase 4);	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173285	4E-38	BLASTX	
	E024, P192	Metionina sintase	<i>Glycine max</i>	AAQ08403	2E-64	BLASTX	
	E024	Treonina sintase	<i>Glycine max</i>	ABC00741	2E-33	BLASTX	
	E024	Arginina descarboxilase (ARGDC) (ADC)	<i>Glycine max</i>	Q39827	4E-50	BLASTX	
	E192	3-isopropilmalato desidrogenase, cloroplasto, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_178171	3E-37	BLASTX	
	P192	Proteína hipotética OsI_005523	<i>Oryza sativa</i>	EAY84290	2E-44	BLASTX	
	E024	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	<i>Glycine max</i>	ABQ96868	8E-58	BLASTX	
	P192	Cisteína sintase	<i>Glycine max</i>	ABO15564	9E-44	BLASTX	
	Biossíntese de ligninas	E024	Cafeoil-CoA O-metiltransferase	<i>Medicago sativa</i>	Q40313	60E-16	BLASTX
		P192	Produto proteico não nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO23440	3E-29	BLASTX
Biossíntese de fenilpropanóides	E024	ALDH2C4 (fluorescência epidérmica reduzida1); 3-cloroalil aldeído desidrogenase (NAD)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566749	9E-22	BLASTX	
	E024, P192	Protoclorofídeo redutase, precursor do cloroplasto (PCR)	<i>Pisum sativum</i>	Q01289	2E-09	BLASTX	
Biossíntese de porfirinas		E024	Protoclorofídeo redutase, precursor do cloroplasto (PCR)	<i>Cucumis sativus</i>	Q41249	2E-30	BLASTX
	Biossíntese de cofatores	E024	Ntdin	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAA88985	9E-48	BLASTX
Regulação hormonal vegetal		E024	Suposto precursor da auxina amida-hidrolase	<i>Populus sp.</i>	CAG32961	4E-59	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Metabolismo de isoprenóides	E024	Receptor de ácido giberélico-b	<i>Gossypium hirsutum</i>	ABQ96123	4E-25	BLASTX
	E024	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase	<i>Camptotheca acuminata</i>	AAB69726	2E-74	BLASTX
	E024	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase	<i>Glycine max</i>	AAD09278	2E-23	BLASTX
Metabolismo de compostos C	P024	S-adenosilmetionina sintetase,	<i>Phaseolus lunatus</i>	AB062358	4E-25	BLASTN
	E024	Enolase	<i>Glycine max</i>	AAS18240	8E-43	BLASTX
	E024, E192	GDP-L-fucose sintase 1 GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manose-3, 5-epimerase-4-reductase 1) (AtGER1) (AtFX)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O49213	9E-78	BLASTX
	E024	Enolase	<i>Glycine max</i>	AY496909	5E-41	BLASTN
	E024	Similar a malato desidrogenase	<i>Iris x hollandica</i>	BAF44222	5E-14	BLASTX
	E024	Precursor do ácido beta-frutofuranosidase (invertase vacuolar)	<i>Vigna radiata</i>	P29001	4E-74	BLASTX
	E024	Precursor do ácido beta-frutofuranosidase (invertase vacuolar)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	O24509	3E-16	BLASTX
	E024	Precursor do ácido beta-frutofuranosidase (invertase vacuolar)	<i>Vicia faba</i>	Q43857	1E-11	BLASTX
	E024	GATL7 (similar a galacturonosiltransferase 7); poligalacturonato 4-alfa-galacturonosiltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_191825	2E-27	BLASTX
	E024, P024	Proteína de 24kDa SC24	<i>Glycine max</i>	AAL69983	1E-11	BLASTX
Degradação extracelular de polissacarídeos	E024	Homólogo da arabinofuranosidase/xilosidase	<i>Prunus persica</i>	BAF43576	4E-59	BLASTX
	E024	Beta-D-xilosidase	<i>Pyrus pyrifolia</i>	BAF79669	5E-31	BLASTX
Ciclo da ribulose monofosfato	E024	Clone gmp1-49d18	<i>Glycine max</i>	AC187645	3E-46	BLASTN

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Ciclo de Calvin	E024, E192, P192	Subunidade menor da rubisco rbcS1	<i>Glycine max</i>	AAG24882	6E-38	BLASTX
	P024, P192	Rubisco ativase alfa 2	<i>Gossypium hirsutum</i>	ABB20913	1E-152	BLASTX
Biossíntese de aminas	P192	PGDH (3-fosfoglicerato desidrogenase); fosfoglicerato desidrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564034	8E-48	BLASTX
	E024	Ativase da rubisco (Rca)	<i>Vigna radiate</i>	AF126870	3E-66	BLASTN
	P192	Enzima biossintética da tiamina	<i>Arachis hypogaea</i>	ABI84250	7E-20	BLASTX
Biossíntese de derivados do ác. dehidroquinico	E192	Suposta 3-desidroquinato sintase	<i>Fagus sylvatica</i>	ABA54866	5E-39	BLASTX
Metabolismo de nitrogênio e enxofre	P192	ATP sulfurilase	<i>Glycine max</i>	AAL74418	3E-78	BLASTX
	P192	Nucleosídeo difosfato quinase	<i>Glycine max</i>	AAN77501	3E-14	BLASTX
Metabolismo de nucleotídeos	E024	Família da 5' nucleotidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199707	6E-10	BLASTX
	E024	Glutamina amidotransferase/ciclase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAA32287	2E-46	BLASTX
	E024	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase	<i>Glycine max</i>	AAL18815	4E-38	BLASTX
	E024	Dihidropirimidinase / DHPase / dihidropirimidina amidohidrolase / hidantoinase (PYD2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568258	6E-40	BLASTX
Metabolismo lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides	P024	Oleato desaturase microsomal FAD2-3	<i>Glycine max</i>	ABF84063	1E-58	BLASTX
	E024	Produto protéico não nomeado similar à família 3-beta hidroxiestóide desidrogenase/isomerase	<i>Vitis vinifera</i>	CAO40548	1E-46	BLASTX
Biossíntese de triterpenos	E024	Fosfatase ácida, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_177122	6E-21	BLASTX
	E024, P024	Progesterona 5-beta-redutase, suposta	<i>Medicago sativa</i>	ABD33275	9E-12	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Assimilação de sulfato	E024	Ferredoxina:sulfito redutase, precursor	<i>Glycine max</i>	AAG59996	1E-27	BLASTX
	E024	S-adenosil-L-metionina sintetase	<i>Beta vulgaris</i>	BAE07179	7E-47	BLASTX
	E024	S-adenosilmetionina sintetase	<i>Phaseolus lunatus</i>	BAB83761	4E-84	BLASTX
	P192	S-adenosil-L-homocisteína hidrolase	<i>Cicer arietinum</i>	CAI56440	8E-15	BLASTX
	P192	S-adenosilmetionina:2- demetilmenaquinone metiltransferase	<i>Oryza sativa</i>	BAB84438	5E-49	BLASTX
Biossíntese de estilbenos e flavonóides	E024	Similar a 4-cumarato-CoA ligase 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P0C5B6	1E-26	BLASTX
	E024	Transferase (antranilato n- hidroxicinamil/benzoiltransferase)	<i>Medicago trunculata</i>	ABD28423	4E-18	BLASTX
	E024	Redutase 1	<i>Hydrangea macrophylla</i>	AAR89809	4E-13	BLASTX
	E192	Chalcona sintase	<i>Glycine max</i>	AAO67373	1E-79	BLASTX
	P192	Família aldo/ceto redutase	<i>Oryza sativa</i>	BAC19952	8E-36	BLASTX
	P192	Produto proteico não nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO41774	4E-34	BLASTX
	E024	3-cetoacil-CoA sintase 12 precursor (KCS- 12)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SIB2	8E-36	BLASTX
	E024	Suposta chalcona isomerase 4	<i>Glycine max</i>	AY595417	1E-122	BLASTN
	P192	2'-hidroxidihidrodaidzeína redutase	<i>Glycine max</i>	CAA06028	4E-38	BLASTX
	E024	Fenilalanina amônia-liase (PAL) classe 2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	P19142	3E-71	BLASTX
	P192	PAL	<i>Glycine max</i>	S46988	1E-104	BLASTN
	E024, P024	PAL1	<i>Astragalus membranaceus</i>	AAX84839	4E-47	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo	
Biossíntese de estilbenos e flavonóides	E024, E192, P192	PAL	<i>Glycine max</i>	JQ1070	1E-70	BLASTX	
	P024	PAL	<i>Medicago sativa</i>	P27990	8E-61	BLASTX	
	E024	PAL2	<i>Pisum sativum</i>	Q04593	4E-10	BLASTX	
	E024	Isoflavona sintase 2	<i>Glycine max</i>	AAT47734	5E-34	BlastX	
Respiração celular	E024	Subunidade da citocromo c oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM63485	4E-46	BLASTX	
	E024	Precursor da fosfoglicerato quinase do cloroplasto	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q42961	5E-88	BLASTX	
Glicólise e neoglicogênese	P024	Fosfoglicerato quinase citosólica	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q42962	9E-26	BLASTX	
	E024	Fosfoglicerato quinase citosólica	<i>Pisum sativum</i>	AAF85975	8E-64	BLASTX	
	E024	Glicer aldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>Glycine max</i>	ABC75834	3E-45	BLASTX	
	E024	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAN75749	4E-29	BLASTX	
	P192	Aldolase	<i>Pisum sativum</i>	AAA33643	7E-72	BLASTX	
	E024	Álcool-desidrogenase	<i>Glycine max</i>	AAC97495	1E-15	BLASTX	
	E192	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase	<i>Morus alba</i>	ABK76304	1E-45	BLASTX	
	P192	Frutose-bisfosfato aldolase	<i>Cicer aretinum</i>	O65735	8E-23	BLASTX	
	E024	Triosefosfato isomerase	<i>Glycine max</i>	AAT46998	1E-31	BLASTX	
	E024	Malato sintase, glixossomo (MS)	<i>Glycine max</i>	P45458	2E-24	BLASTX	
	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos	E024	Citrato sintase, precursor do glixossomo	<i>Cucurbita maxima</i>	P49299	1E-54	BLASTX
		E024	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAN74538	5E-79	BLASTX
P192		SDH1-1 (Succinato desidrogenase 1-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O82663	2E-52	BLASTX	

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo	
Complexo piruvato desidrogenase	E024	Piruvato desidrogenase e1 alfa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171617	3E-17	BLASTX	
	P024	Precursor do cloroplasto da NADP-enzima málica	<i>Nicotiana tabacum</i>	ABI98682	9E-45	BLASTX	
	E024	Plastocianina	<i>Vicia faba</i>	P00288	4E-26	BLASTX	
	E024	Proteína do fotossistema II de 10 kDa	<i>Arachis hypogaea</i>	ABC46708	4E-47	BLASTX	
	E024	Centro de reação do fotossistema I, subunidade XI Psal	<i>Medicago trunculata</i>	ABD28376	7E-29	BLASTX	
	E024	Proteína de ligação à clorofila a/b P4, precursor do cloroplasto	<i>Pisum sativum</i>	Q9SQL2	5E-34	BLASTX	
	E024	Suposta LHCI tipo III, proteína de ligação à clorofila a/b	<i>Vigna unguiculata</i>	CAO02554	1E-69	BLASTX	
	Fotossíntese	E024	Proteína de ligação à clorofila a/b	<i>Retama raetam</i>	AF439282	4E-41	BLASTN
		E024	Produto proteico não nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO46405	1E-15	BLASTX
		E024, E192	Polipeptídeo CP29 tipo I (26 kD)	<i>Solanum lycopersicum</i>	CAA43590	6E-16	BLASTX
E024, E192		Proteína do fotossistema II 10 kDa do cloroplasto	<i>Arachis hypogaea</i>	DQ296038	7E-33	BLASTN	
	E024, E192, P192	Fotossistema I subunidade Psad	<i>Glycine max</i>	ABQ63097	5E-41	BLASTX	
	E024, E192, P192	Suposta proteína de ligação à clorofila a/b	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM65936	3E-65	BLASTX	
	E024, P192	Proteína de ligação à clorofila a/b tipo II	<i>Glycine max</i>	AAL29886	2E-56	BLASTX	

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
	P192	“Oxygen-evolving enhancer protein” do cloroplasto	<i>Manihot esculenta</i>	AAV74404	7E-60	BLASTX
	P192	Proteína hipotética OsI_028334	<i>Oryza sativa</i>	EAZ07102	3E-61	BLASTX
	E024	Proteína de ligação à clorofila a/b	<i>Solanum lycopersicum</i>	1609235A	4E-21	BLASTX
	E024	Proteína de ligação à clorofila a/b	<i>Glycine max</i>	AAA80688	4E-11	BLASTX
	E192	Proteína de ligação à clorofila a/b, LHCl tipo II CAB, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_198197	8E-39	BLASTX
	P192	Proteína do cloroplasto de aumento da fluorescência da clorofila pós-iluminação	<i>Nicotiana tabacum</i>	ABI51594	5E-15	BLASTX
Fotossíntese	E024	Ferredoxina que interage com Tsp1	<i>Nicotiana tabacum</i>	ABB30150	5E-12	BLASTX
	E192	Precursor do cloroplasto da “oxygen-evolving enhancer protein 2” (OEE2)	<i>Pisum sativum</i>	P16059	7E-44	BLASTX
	E024	Proteína do fotossistema I psaH	<i>Arachis hypogaea</i>	ABI84258	4E-14	BLASTX
	E024, P192	Proteína hipotética (similar a proteína de ligação à clorofila a/b)	<i>Vitis vinifera</i>	CAN76428	3E-45	BLASTX
	E024, P192	Proteína de ligação à clorofila a/b do fotossistema II tipo I	<i>Glycine max</i>	AAA50172	1E-121	BLASTX
	E192, P192	Proteína de ligação à clorofila a/b CP29	<i>Vigna radiate</i>	AAD27878	9E-35	BLASTX
	E192, P192	Centro de reação do fotossistema I, subunidade III	<i>Vigna radiate</i>	AAD27880	4E-29	BLASTX
	P024	Precursor do cloroplasto da “oxygen-evolving enhancer protein 1” (OEE1)	<i>Pisum sativum</i>	P14226	1E-35	BLASTX
Senescência	Todas	Suposta proteína associada a senescência	<i>Pisum sativum</i>	BAB33421	5E-64	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Aminoacil-tRNA sintetase	E024	Profil-tRNA sintetase	<i>Raphanus sativus</i>	BAC78194	4E-30	BLASTX
	E024	Suposta proteína ribossômica L39 60S	<i>Oryza sativa</i>	BAD19088	5E-15	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica L26	<i>Zea mays</i>	AAC64166	2E-15	BLASTX
	E024	Homólogo da proteína ribossômica L27	<i>Pisum sativum</i>	AAA86950	1E-23	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica L33	<i>Castanea sativa</i>	AAK25760	1E-22	BLASTX
	E024	Similar a proteína ribossômica L7Ae	<i>Brassica rapa</i>	ABL97959	7E-12	BLASTX
	E024	Similar a proteína ribossômica S27	<i>Solanum tuberosum</i>	ABA40465	2E-35	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica S3a	<i>Cicer arietinum</i>	CAD56219	6E-56	BLASTX
	P192	Proteína ribossômica L23	<i>Spinacia oleracea</i>	CAA63112	1E-32	BLASTX
	Proteínas ribossomais	E024	Proteína ribossômica L9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAD95213	9E-30
E024		Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAN62522	5E-36	BLASTX
E024		Proteína ribossômica 40S	<i>Solanum tuberosum</i>	ABA40437	9E-48	BLASTX
E024		Proteína ribossômica S25 40S	<i>Glycine max</i>	AAQ22726	1E-32	BLASTX
E024		Proteína ribossômica L21 60S	<i>Oryza sativa</i>	ABF93903	9E-71	BLASTX
E024		Proteína ribossômica L30 60S	<i>Lupinus luteus</i>	O49884	3E-58	BLASTX
E024		Proteína ribossômica L34 60S	<i>Solanum tuberosum</i>	ABO92971	5E-37	BLASTX
E024		Proteína ribossômica L44 60S	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q96499	3E-12	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
	E024	60S proteína ribossômica 60S P1 (RPP1C)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NIM_001085259	6E-13	BLASTN
	E024	Cyc07	<i>Vitis vinifera</i>	AAX55706	6E-27	BLASTX
	P024	Proteína ribossômica 60S L13A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199687	3E-54	BLASTX
	P192	Proteína ribossômica 60S L37a	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Q9ZRS8	5E-23	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica 30S família S18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_172201	5E-17	BLASTX
Proteínas ribossomais	E024	Proteína ribossômica 40S S8	<i>Oryza sativa</i>	P49199	7E-27	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica 50S L9, cloroplasto	<i>Ipomoea trifida</i>	Q6JJ61	5E-13	BLASTX
	P192	Proteína ribossômica acídica 60S P0	<i>Glycine max</i>	P50346	6E-27	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica 60S L6	<i>M. crystallinum</i>	P34091	8E-16	BLASTX
	E024	Proteína induzida pelo frio (L13e)	<i>Brassica rapa</i>	ABL97945	4E-26	BLASTX
	E024	Similar ao mRNA da proteína ribossômica L19	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	EF571300	8E-12	BLASTN
	E024	Proteína ribossômica L9 60S	<i>Pisum sativum</i>	P30707	1E-44	BLASTX
	E024	Proteína ribossômica L7A 60S (RPL7aA)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_182283	6E-18	BLASTX
	E024	Fator de alongação da tradução (EF)	<i>Triticum aestivum</i>	AAP80650	2.00E-38	BLASTX
	E024	Suposto EF2	<i>Oryza sativa</i>	BAD26337	4.00E-83	BLASTX
Fatores de tradução	E024, P192	EF1- $\alpha$	<i>Glycine max</i>	P25698	6.00E-92	BLASTX
	E024, P192	Relacionado ao fator de iniciação da tradução eucariótico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_565058	3.00E-48	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
	P192	Suposto fator de iniciação da tradução eucariótico 3E	<i>Betula pendula</i>	CAM91265	4E-74	BLASTX
	E024	EF1-γ; Glutathione S-transferase, C-terminal	<i>Medicago trunculata</i>	ABE91935	7E-32	BLASTX
Fatores de tradução	E024	EF-G, precursor do cloroplasto	<i>Glycine max</i>	P34811	2E-30	BLASTX
	E024	Fator de iniciação da tradução eucariótico 4A	<i>Lolium perenne</i>	ABS19813	2E-10	BLASTX
	P192	EF1-A, SMV proteína relacionada à resistência	<i>Glycine max</i>	AY651886	1E-65	BLASTN
	E024	mRNA do EF1-α	<i>Pisum sativum</i>	X96555	3E-11	BLASTN
	E024	Nodulina-26	<i>Glycine max</i>	AAA02946	4E-34	BLASTX
	E024	Proteína rica em prolina de 14 kDa	<i>Glycine max</i>	AAC49369	1E-30	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO49027	3E-40	BLASTX
Localização: membrana	E024	Proteína contendo o domínio SPX	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568312	2E-37	BLASTX
	E024, P024, P192	Suposta similar a MtN3	<i>Dianthus caryophyllus</i>	AF151726	6E-13	BLASTN
Localização: plastídeo	E024	4-alfa-glucanotransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAB86444	8E-31	BLASTX
Proteína de estocagem	E024	Precursor de glicoproteína de 28 kDa	<i>Glycine max</i>	P15490	2E-51	BLASTX
Transcritase reversa	E024, P192	Suposta Ty1-copia transcritase reversa parcial e pseudogene parcial DfRedu	<i>Platanus x acerifolia</i>	AM397241	3E-11	BLASTN
Transcrição	E024	RNA polimerase II 15.9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196554	5E-38	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
	E024	HD-Zip proteína 2 de classe III	<i>Populus trichocarpa</i>	AAX19051	3E-45	BLASTX
	P192	Fator de transcrição relacionado a AP2.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_177931	5E-18	BLASTX
	E024	Família protéica dedo de zinco tipo-CCCH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179571	2E-17	BLASTX
	P192	Produto protéico não-nomeado; família GRAS	<i>Vitis vinifera</i>	CAO60903	1E-33	BLASTX
Fatores de transcrição	P192	WRKY21	<i>Glycine max</i>	ABC26913	5E-10	BLASTX
	E024	Fator de transcrição MYB176	<i>Glycine max</i>	ABH02865	6E-11	BLASTX
	E024	Fator de transcrição bZIP96	<i>Glycine max</i>	DQ787047	1E-128	BLASTN
	E024	Fator de transcrição MYB149	<i>Glycine max</i>	DQ822989	1E-29	BLASTN
	P192	Fator de transcrição bZIP60	<i>Glycine max</i>	DQ787038	4E-78	BLASTN
	E024	Fator de transcrição bZIP108	<i>Glycine max</i>	DQ787023	1E-153	BLASTN
	P192	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO22117	5E-76	BLASTX
	E024	Metiltransferase S-adenosilmetionina-dependente	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567348	2E-16	BLASTX
Processamento de RNA	E024	Produto protéico não-nomeado, suposta proteína associada a U1 RNApn (LUC7)	<i>Vitis vinifera</i>	CAO22940	3E-46	BLASTX
	E024	Proteína supersensitiva a ABA e à seca	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199698	2E-14	BLASTX
	E024	Suposta fibrilarina 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK76701	5E-17	BLASTX
	E024	Proteína hipotética com domínio central poli (A) polimerase	<i>Vitis vinifera</i>	CAN69980	4E-57	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Processamento de RNA	E024	rRNA 2'-O-metiltransferase fibrilarina 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FEF8	9E-14	BLASTX
	E024, P192	Suposta rRNA 23S pseudouridina sintase	<i>Vigna unguiculata</i>	AM748496	4E-30	BLASTN
Metabolismo de RNA	E024	RNA helicase ATP-dependente AT2G28600	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_128420	6E-10	BLASTN
Proteína com função de ligação a cálcio	E024	Proteína tumoral traducionalmente-controlada	<i>Glycine max</i>	Q944T2	8E-53	BLASTX
	P024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO63240	4E-30	BLASTX
Ligação a DNA	E024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO65716	5E-17	BLASTX
Ligação a metal pesado	P192	Ligação ao íon zinco	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001031691	1E-23	BLASTX
Ligação a ácido nucleico	E024	Subunidade CPSF A; similar a WD40	<i>Medicago trunculata</i>	ABP03867	7E-64	BLASTX
	E024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO48315	3E-58	BLASTX
	E024	Proteína com a repetição WD-40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199910	2E-45	BLASTX
Ligação a proteína	E024	Anquirina	<i>Medicago trunculata</i>	ABD32722	1E-68	BLASTX
	E024	EMB2750	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_187294	8E-47	BLASTX
Ligação a RNA	P192	Proteína quinase beta 1 5'-AMP-ativada	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568573	2E-12	BLASTX
Ativador enzimático	E024	Proteína de ligação a oligonucleotídeo	<i>Solanum tuberosum</i>	ABB72820	2E-10	BLASTX
	E024, P024	Fator de ribosilação de ADP A1B; ativador de fosfolipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196971	3E-58	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Ativador de protease	P192	F1N21.7; fator de maturação do proteossomo 20S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG00256	1E-26	BLASTX
	E024	Inibidor de cisteína protease (cistatina)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566425	7E-11	BLASTX
	E024	Multicistatina	<i>Vigna unguiculata</i>	AAQ62561	1E-67	BLASTX
Inibidor de protease	E024	Inibidor de proteinase I9 (subtilisina)	<i>Medicago trunculata</i>	ABD33266	2E-45	BLASTX
	P192	Inibidor de cisteína proteinase	<i>Glycine max</i>	AAA97907	1E-19	BLASTX
	E024	Inibidor de cisteína proteinase (cistatina)	<i>Vigna unguiculata</i>	Q06445	6E-18	BLASTX
	E024	Inibidor de tripsina p20	<i>Glycine max</i>	BAA82254	3E-21	BLASTX
Transportadores ABC	E024	ATMRP10 proteína associada a resistência a multídrogas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_191829	6E-51	BLASTX
Transporte de aminoácidos	E024	Permease de aminoácido AAP3	<i>Vicia faba</i>	CAC51424	8E-42	BLASTX
	E024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO65827	2E-12	BLASTX
Antiporters	P024	Proteína carreadora de ADP, ATP do cloroplasto, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173003	2E-35	BLASTX
Transporte de cátions	P024	AT5g44240/MLN1_17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAL31943	3E-21	BLASTX
	E024, P192	Transportador de magnésio similar a CorA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_188598	3E-29	BLASTX
Transporte de carboidratos	P192	Alfa-L-arabinofuranosidase	<i>Malus x domestica</i>	AAP97437	8E-23	BLASTX
Transporte por poro ou canal	E024	Aquaporina PIP2-7	<i>Zea mays</i>	Q9ATM4	2E-66	BLASTX
	E024	Aquaporina PIP1;1	<i>Medicago trunculata</i>	AAK66766	3E-51	BLASTX
Transporte no cloroplasto	P192	Translocase mitocondrial, subunidade Tim17/22	<i>Medicago sativa</i>	ABN08635	9E-48	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Transporte de prótons	E024	Pirofosfatase de prótons	<i>Vigna radiata</i>	BAA23649	5E-54	BLASTX
	E024	Bomba de prótons ancorada à membrana vacuolar energizada por pirofosfato	<i>Vigna radiata</i>	P21616	6E-33	BLASTX
	P192	ATPase de prótons de membrana	<i>Sesbania rostrata</i>	BAC77530	3E-59	BLASTX
	E024	Suposta proteína endomembrana 70	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_563881	6E-32	BLASTX
Transporte do ER ao complexo de Golgi	E024	Proteína similar a subunidade "coatomer alpha"	<i>Lotus japonicus</i>	CAE45585	5E-49	BLASTX
	E024	Partícula de transporte (TRAPP) Bet3	<i>Medicago trunculata</i>	ABN08153	1E-74	BLASTX
Transporte de metais pesados	E024	Proteína contendo domínio associado a metal pesado	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_195958	2E-16	BLASTX
	E024	Suposta COPT5	<i>Oryza sativa</i>	BAD36154	7E-11	BLASTX
Canais iônicos	P192	Canal iônico seletivo mitocondrial voltagem-dependente	<i>Phaseolus coccineus</i>	AAV82249	3E-54	BLASTX
	P192	VDAC1.3	<i>Lotus corniculatus</i>	AAQ87021	1E-21	BLASTX
	P192	Canal de cálcio de dois poros	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAD15100	1E-12	BLASTX
Transporte nuclear	E024	Importina beta-2, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_200160	1E-72	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado similar a carioferina (importina) beta	<i>Vitis vinifera</i>	CAO24673	4E-43	BLASTX
	P192	HEAT	<i>Medicago trunculata</i>	ABN08982	4E-11	BLASTX
Transporte de fosfato	E024	Relacionado a translocação de fosfato	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568469	2E-32	BLASTX
	P192	Família protéica fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS) redutase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568117	8E-56	BLASTX
Sistema fosfotransferase	P192	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO63022	3E-56	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Transporte protéico	E024	Proteína relacionada a Ras Rab11C	<i>Lotus japonicus</i>	Q40193	5E-50	BLASTX
	E024, P192	Similar a transportador de sorbitol	<i>Glycine max</i>	CAD91337	2E-65	BLASTX
Transporte de açúcar	E192, P192	Transportador de sacarose SUF1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ABB30165	7E-16	BLASTX
	P192	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO62526	6E-40	BLASTX
Sistema de secreção V	P192	TatC	<i>Pisum sativum</i>	AAK93948	2E-30	BLASTX
	E024	Homólogo à subunidade de ligação a ATP da ATP-dependente Ctp protease CD4A	<i>Solanum lycopersicum</i>	P31541	4E-52	BLASTX
ATPases de transporte	E024	Família flipase, ATPase tipo-P de translocação de fosfolípido	<i>Oryza sativa</i>	ABF95802	2E-26	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO61583	3E-30	BLASTX
Transporte celular	P024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO46022	5E-23	BLASTX
	E024	Canal controlado por nucleotídeo cíclico B (CNGC-B)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AF492817	5E-52	BLASTN
Transdução de sinal mediada por Ca <sup>2+</sup>	E024	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAN72862	9E-25	BLASTX
	P192	Proteína quinase cálcio dependente calmodulina independente	<i>Cucumis sativus</i>	CAC83060	2E-20	BLASTX
Transdução de sinal mediada por enzima	E024	Proteína quinase responsiva a etileno TCTR1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAD46406	1E-23	BLASTX
	E192	Similar a subunidade beta da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina	<i>Glycine max</i>	Q39836	1E-51	BLASTX
Cascata de proteínas quinase	E024	Similar a quinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA16700	8E-31	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO68512	3E-35	BLASTX
	E024	Proteína quinase que interage com CBL	<i>Vigna unguiculata</i>	AB303675	8E-25	BLASTN
	E024	Proteína quinase que interage com CBL	<i>Vigna unguiculata</i>	BAF74756	7E-83	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Cascata de proteínas quinase	P192	BON1, ligação a fosfolipídeo cálcio-dependente	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568944	4E-40	BLASTX
	P192	Proteína quinase contendo domínio aaRF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9ASX5	6E-19	BLASTX
	E024	MAPKK	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAE95414	9E-14	BLASTX
	P192	MAPKK	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAU04435	1E-68	BLASTX
	E024	MAPKK	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAU04436	1E-43	BLASTX
Transdução de sinal mediada por polifosfoinositol	E024	Fosfolipase C fosfatidilinositol específica	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAC22506	6E-50	BLASTX
	E024	Inositol fosfato quinase	<i>Glycine max</i>	ABU93833	3E-41	BLASTX
	E024	Fosfolipase D alfa 1 (PLD alfa 1)	<i>Vigna unguiculata</i>	O04865	8E-53	BLASTX
	P192	Fosfolipase D2	<i>Craterostigma plantagineum</i>	CAB43062	1E-63	BLASTX
Sinalização por receptor transmembrana serina/treonina quinase	E024	Família ser/tre fosfotransferase contendo repetição kelch	<i>Oryza sativa</i>	Q2QM47	1E-82	BLASTX
	E024	Fosfoenolpiruvato carboxilase quinase	<i>Glycine max</i>	AAN12513	2E-20	BLASTX
	E024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO66241	1E-62	BLASTX
	E024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO21831	7E-49	BLASTX
	E192	Similar a receptor de proteína quinase RK20-1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AAD21872	1E-50	BLASTX
	P192	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	<i>Flaveria pringlei</i>	BAB43909	1E-23	BLASTX
	P192	Proteína quinase MK5	<i>M. crystallinum</i>	AAF40430	9E-14	BLASTX
	E024	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO21296	1E-49	BLASTX
	P192	Produto proteico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO23404	3E-26	BLASTX
	E024	Proteína quinase transmembrana LRR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_189486	1E-12	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Apoptose	E024	Produto protéico não nomeado similar à proteína scythe	<i>Vitis vinifera</i>	CAO39944	2E-13	BLASTX
	E024	Proteína hipotética OsJ_006503	<i>Oryza sativa</i>	EAZ23020	2E-11	BLASTX
Modificação protéica	E024, E192, P192	Metionina sulfoxido redutase A	<i>Populus trichocarpa x deltoides</i>	AAS46231	1E-77	BLASTX
	E024	Produto protéico não nomeado similar a chaperonina GroEL tipo 1	<i>Vitis vinifera</i>	CAO15358	1E-42	BLASTX
Chaperonas	E024	Produto protéico não nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO50090	4E-65	BLASTX
	E024	Proteína de choque térmico 70, suposta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_850984	1E-28	BLASTX
	E024	Similar a chaperona HSP20	<i>Medicago trunculata</i>	ABC75374	5E-35	BLASTX
	E024	Chaperona molecular Hsp90-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAR12194	4E-39	BLASTX
	E024	Proteína de maturação da semente PM37	<i>Glycine max</i>	AAD51625	1E-41	BLASTX
	E024, P024	Similar a Hsr203J	<i>Glycine max</i>	ABB88835	2E-45	BLASTX
	E024, P192	Precursor proteína de choque térmico 70	<i>Citrullus lanatus</i>	AAC03416	2E-36	BLASTX
	P024	Proteína de choque térmico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAF01597	1E-33	BLASTX
	P192	Similar a DnaJ	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AAB36543	5E-19	BLASTX
	P192	Precursor da proteína de choque térmico (HSP110/subfamília SSE1)	<i>Phillyrea latifolia</i>	CAK18863	3E-30	BLASTX
E024	Chaperonina CPN60-1, precursor mitocondrial (HSP60-1)	<i>Cucurbita maxima</i>	Q05045	5E-41	BLASTX	
E024	Similar a chaperonina GroEL ATPase	<i>Medicago trunculata</i>	ABE86688	7E-57	BLASTX	
E024	Suposta chaperonina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_187789	2E-47	BLASTX	

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
	E024	Similar a culina 1	<i>Pisum sativum</i>	BAC10548	1E-36	BLASTX
	E024	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	CAN72172	5E-30	BLASTX
	E024	Proteína hipotética	<i>Cleome spinosa</i>	ABD96879	3E-29	BLASTX
	P192	Proteína hipotética similar a ubiquitina ligase	<i>Oryza sativa</i>	EAZ14869	5E-13	BLASTX
	P192	Proteína hipotética OsI_005977	<i>Oryza sativa</i>	EAY84744	9E-79	BLASTX
	E024	Subunidade beta do proteossomo 20S	<i>Cicer arietinum</i>	CAA09603	4E-26	BLASTX
	E024	Poliubiquitina	<i>Triticum aestivum</i>	ABU40645	4E-72	BLASTX
	E024	Subunidade D do proteossomo 20S alfa	<i>Cicer arietinum</i>	Q9SXU1	1E-42	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO66155	5E-25	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado com domínio PINT	<i>Vitis vinifera</i>	CAO49178	1E-33	BLASTX
Degradação protéica relacionada a ubiquitina/proteossomo	P192	Família F-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199429	9E-22	BLASTX
	E024	Similar a família F-box	<i>Oryza sativa</i>	BAD22389	7E-12	BLASTX
	E024	Proteína da família F-box contendo repetição kelch	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564193	5E-15	BLASTX
	E024	Tetra-ubiquitina	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	AAC67551	1E-23	BLASTX
	E024	Ubiquitina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABH08753	1E-36	BLASTX
	E024	Enzima E2 de conjugação a ubiquitina	<i>Solanum lycopersicum</i>	CAA51821	2E-51	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO44902	2E-10	BLASTX
	P192	SINA1	<i>Medicago trunculata</i>	ABW70159	7E-81	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Degradação protéica isossomal	E024	Peptidase C1A, papaína	<i>Medicago trunculata</i>	ABD32840	1E-26	BLASTX
Degradação protéica no cloroplasto	E024	Suposta cloroplasto protease	<i>Oryza sativa</i>	BAD45447	2E-64	BLASTX
	E192, P192	Tiol protease isoforma B	<i>Glycine max</i>	AAB16996	2E-76	BLASTX
	E024	Família protéica aspartil protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568551	1E-44	BLASTX
	E024	Família protéica aspartil protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567506	6E-23	BLASTX
	E024	Cisteína protease	<i>Anthurium andraeanum</i>	AAP41846	2E-26	BLASTX
	E024	Cisteína protease-1	<i>Helianthus annuus</i>	BAC75923	6E-11	BLASTX
Degradação protéica (local indeterminado)	E024	Cisteína protease CP2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	BAF03553	3E-46	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO44385	3E-16	BLASTX
	E024	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO43564	1E-41	BLASTX
	Todas	Cisteína protease	<i>Medicago sativa</i>	ABF18679	6E-65	BLASTX
	E024	Cisteína protease	<i>Vigna mungo</i>	BAA92495	2E-18	BLASTX
	P192	Proteína de ligação ao DNA cnd41	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB96832	2E-30	BLASTX
	P192	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO43223	7E-12	BLASTX
	P192	Precursor da cisteína protease	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CAB17076	1E-17	BLASTX
Resposta brassinosteróide	E024	Proteína induzida pela TGF-beta	<i>Platanus x acerifolia</i>	CAJ91144	4E-40	BLASTX
Resposta a giberelina	E024	GAI1	<i>Glycine max</i>	ABO61516	6E-48	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Resposta sinalizada por ácido jasmônico	E024	Lipoxigenase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ABM88259	1E-14	BLASTX
	E024	Lipoxigenase	<i>Glycine max</i>	AAC49159	6E-53	BLASTX
	E024, P192	Lipoxigenase-4 (L-4)	<i>Glycine max</i>	P38417	2E-28	BLASTX
	E024	Lipoxigenase	<i>Sesbania rostrata</i>	CAC43237	1E-55	BLASTX
	E024	Lipoxigenase	<i>Glycine max</i>	AA96817	1E-46	BLASTX
Resposta a estímulo mecânico	P192	Proteína responsiva a ferimento	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_177671	3E-16	BLASTX
Resposta hipersensitiva	E024	ORF capaz de induzir lesões HR	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAC49975	1E-16	BLASTX
	E024	Proteína 14-3-3	<i>Glycine max</i>	CAA06198	8E-13	BLASTX
Proteína de reconhecimento de patógeno	E024	Precursor da "Rieske iron-sulphur"	<i>Glycine max</i>	CAM57107	2E-40	BLASTX
Proteínas relacionadas à patogênese	E192, P192	Precursor da PR1a	<i>Glycine max</i>	AAD33696	1E-50	BLASTX
	E024	Precursor da endochitinase PR4	<i>Phaseolus vulgaris</i>	P27054	2E-26	BLASTX
	P024, P192	Similar a PR 2	<i>Glycine max</i>	CAA42647	2E-74	BLASTX
	E024	Proteína rica em cisteína similar a Snakin	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AM158277	7E-17	BLASTN
Proteína de defesa	P192	Calreticulina-1	<i>Glycine max</i>	BAF36056	6E-23	BLASTX
	E192, P192	Proteína P21	<i>Glycine max</i>	P25096	2E-55	BLASTX
	E192, P192	Similar a NtPRp27	<i>Atropa belladonna</i>	CAC40754	1E-47	BLASTX
	P192	Produto protéico não-nomeado	<i>Vitis vinifera</i>	CAO70846	3E-27	BLASTX
	P192	Precursor da dissulfido-isomerase (PDI)	<i>Medicago sativa</i>	P29828	1E-36	BLASTX
Resposta a dano no DNA	P192	Proteína endomembrana	<i>Medicago sativa</i>	AAA32662	9E-38	BLASTX
	P192	Enzima biossintética do tiazol	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	AAV92537	3E-67	BLASTX
	P192	Enzima biossintética do tiazol 1-1, precursor do cloroplasto	<i>Zea mays</i>	Q41738	1E-19	BLASTX
Resposta a UV	E024	Proteína repressível por ultravioleta-B	<i>Gossypium hirsutum</i>	AAS58469	2E-24	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Produção de espécies reativas de oxigênio	P192	Similar a germina	<i>Pisum sativum</i>	CAA11031	2E-13	BLASTX
	E024	Beta-aminina and soforadiol 24-hidroxiase	<i>Glycine max</i>	BAE94181	1E-30	BLASTX
Detoxificação envolvendo citocromo P450	Todas	TBP, similar a citocromo P450	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAA10929	2E-30	BLASTX
	P192	Citocromo P450 monoxigenase CYP81E11	<i>Glycine max</i>	ABC68401	3E-74	BLASTX
	P192	Citocromo P450 monoxigenase CYP83E8	<i>Glycine max</i>	ABC68397	4E-48	BLASTX
	Todas	Proteína hipotética	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAF01964	3E-44	BLASTX
Detoxificação de íons e radicais	Todas	Citocromo P450 monoxigenase	<i>Zea mays</i>	T02955	3E-43	BLASTX
	E024	Catalase (cat4) da soja	<i>Glycine max</i>	AF035255	5E-29	BLASTN
	E024	Catalase-4	<i>Glycine max</i>	O48561	6E-63	BLASTX
	P192	Proteína In2-1	<i>Glycine max</i>	AAG34872	6E-46	BLASTX
	E024	Transportador de glutatona GT1	<i>Brassica juncea</i>	CAD91127	4E-32	BLASTX
	E024	Glutaciona S-transferase GST 8	<i>Glycine max</i>	AAG34798	2E-69	BLASTX
	P192	Precursor da metionina sulfóxido redutase B1 do cloroplasto	<i>Nicotiana tabacum</i>	ABU49227	7E-40	BLASTX
	P192	MnSOD	<i>Glycine max</i>	EF587264	2E-78	BLASTN
	E024	Ferro-superóxido dismutase	<i>Glycine max</i>	AAQ13492	1E-52	BLASTX
	Resposta a estresse	E024	STT3A (similar a staurosporina e sensitiava a temperatura 3 A)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568380	3E-34
E024		Homólogo a proteína Lea14	<i>Glycine max</i>	P46519	1E-40	BLASTX
Resposta de proteínas não-dobradas	P192	Família "rubber elongation factor" (REF)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176904	6E-27	BLASTX
	E024	SEL-1	<i>Glycine max</i>	BAE02648	2E-48	BLASTX

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Função molecular	Biblioteca	Similar	Espécie	Acesso	Valor-e	Algoritmo
Degradação de compostos exógenos	E024	Proteína hipotética, suposta serina-protease similar a tripsina periplasmática	<i>Vitis vinifera</i>	CAN59793	2E-13	BLASTX
	E024, P024	Metaloproteinase de matriz MMP2	<i>Glycine max</i>	AAL27029	5E-67	BLASTX
	E024	Suposta beta-1,3-glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAF01341	2E-20	BLASTX
	E192, P024, P192	Precursor da glucam endo-1,3-beta-glucosidase	<i>Glycine max</i>	Q03773	3E-76	BLASTX
	E192, P192	Quitinase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CAA40474	2E-55	BLASTX
	E192, P192	Endo-1,3-beta-glucanase	<i>Glycine max</i>	AAR26001	1E-56	BLASTX
	P192	Beta-1,3-glucanase	<i>Glycine max</i>	AAB03501	1E-64	BLASTX
	P192	Pseudo-heveína	<i>Hevea brasiliensis</i>	CAB62537	5E-40	BLASTX
	E024	precursor da gama-glutamil hidrolase	<i>Glycine max</i>	P93164	4E-32	BLASTX