

CYNTHIA MARIA DE OLIVEIRA BORGES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A RESPOSTA
DE DEFESA DO FEIJOEIRO COMUM À FERRUGEM**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

CYNTHIA MARIA DE OLIVEIRA BORGES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A RESPOSTA
DE DEFESA DO FEIJOEIRO COMUM À FERRUGEM**

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

APROVADA: 07 de março de 2001

Prof. Wagner Campos Otoni

Dra. Marta Martins Fonseca

Profa. Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Dra. Ana Lilia Alzate-Marin

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Aos meus pais, Antônio e Adelina,
À minha irmã, Tatiana,
À minha sobrinha e afilhada, Júlia,
Ao meu querido Leonardo.

AGRADECIMENTO

A Deus, por me dar forças para vencer mais um objetivo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do Curso; e em especial, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pelas ótimas condições de trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante a graduação, quando era participante do Programa Especial de Treinamento, e durante o Mestrado.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe pelo apoio e incentivo, e à minha sobrinha Júlia, cuja recente chegada deu ânimo e alegria à nossa família.

Ao meu querido noivo Leonardo, pelo amor e carinho, mas principalmente pela paciência, preocupação e ajuda efetiva, sem os quais não seria possível concluir esse trabalho.

À Beatriz de Castro Amorim, pelo exemplo de compreensão e solidariedade humana, e por me ajudar a ver que as coisas não são tão ruins como nós imaginamos.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, pela confiança, pela amizade durante todo o curso e pela oportunidade de trabalhar na Empresa Agrogenética.

À Professora Conselheira Elza Fernandes de Araújo, pelas sugestões, pela amizade e pela preocupação e interesse com minha formação acadêmica.

Ao Professor Conselheiro Maurílio Alves Moreira, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e à UFV e pela oportunidade de trabalhar na Empresa Agrogenética.

Ao Professor Conselheiro Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelas ótimas sugestões.

À Dra. Marta Fonseca Martins, pelas sugestões e discussão dos resultados, pela amizade, e por sempre demonstrar interesse em solucionar minhas dúvidas de Biologia Molecular.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni por ter aceito o convite de participar da banca examinadora e por suas sugestões.

À Dra. Ana Lilia Alzate-Marin por se dispor, gentilmente, a participar da banca examinadora e por contribuir com importantes sugestões.

À estudante de doutorado em Microbiologia Agrícola, Andréa Barros Ribon, pela amizade, paciência, e, principalmente, pelos ensinamentos práticos de manipulação de radioisótopos e discussões dos resultados.

Ao estudante de mestrado Vilmar Antônio Ragagnin e ao pesquisador da CEPEC/ CEPLAC, Fábio Gelape Faleiro, por cederem o material vegetal deste trabalho e por solucionarem minhas dúvidas sobre as técnicas de manipulação de *Uromyces appendiculatus* e de avaliação da ferrugem do feijoeiro.

Ao Dr. Ronan Xavier Corrêa, pelos ensinamentos iniciais das técnicas de manipulação de ácidos nucleicos, durante o seu Doutorado na UFV, e por sempre ser acessível e amigo, ajudando-me nos experimentos com a ferrugem.

Aos amigos do Laboratório de Seqüenciamento e Análise de Fragmentos de DNA: Marta, Jay, Abelmon, Valéria, Ana Cristina, Francismar e Maria Luiza, pela ótima convivência e ajuda mútua, pelos momentos de distração no cafezinho e pelas ótimas discussões sobre qualquer assunto.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas I (Biomol) e II (Proteína) e do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, pela agradável convivência e pela ajuda.

A todos os amigos e pessoas, que de alguma maneira, colaboraram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

Cynthia Maria de Oliveira Borges, filha de Antônio Borges e Adelina Cândida de Oliveira Borges, nasceu no dia 14 de fevereiro de 1976, na cidade de Belo Horizonte, MG.

Em 1994, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa - UFV, onde, em 16 de outubro de 1998, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas. Durante a graduação participou do Programa Especial de Treinamento - PET (1995/98), além de desenvolver atividades de Iniciação Científica nas linhas de pesquisa Genética Molecular de Plantas (1997/98), no BIOAGRO/UFV; e Citogenética Vegetal (1995/97), no Departamento de Biologia Geral/UFV.

Em 26 de outubro de 1998, ingressou no curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento da UFV, defendendo tese de Mestrado em 07 de março de 2001.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. Objetivo Geral.....	2
1.1.2. Objetivos Específicos.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O Feijoeiro.....	4
2.2. A Ferrugem e seu Controle	5
2.3. Interação Planta-Patógeno e Resistência.....	7
2.4. Base Genética da Resistência.....	8
2.5. Controle da Expressão de Genes Relacionados à Defesa.....	9
2.6. Resposta de Defesa no Feijoeiro	11
2.6.1. Proteínas Relacionadas à Patogênese.....	12
2.6.2. Proteínas Hidrolíticas Relacionadas à Defesa.....	14
2.6.3. Enzimas de Vias Biossintéticas Relacionadas à Resposta de Defesa	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material Genético.....	20

3.2. Inoculação das Plantas e Coleta das Folhas para Extração de RNA	
Total	21
3.3. Extração de RNA Total	22
3.4. Síntese da Primeira Fita de cDNA	23
3.5. Construção dos <i>Primers</i> Específicos	24
3.6. Amplificação e Separação dos Fragmentos RT-PCR.....	25
3.7. Clonagem, Seqüenciamento e Análise dos Fragmentos	26
3.8. Análise da Expressão Temporal Específica por <i>Northern blot</i>	27
3.8.1. Transferência do RNA Total e sua Fixação à Membrana	27
3.8.2. Marcação da Sonda	28
3.8.3. Hibridização	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Extração de RNA Total e RT-PCR.....	30
4.2. Clonagem, Seqüenciamento e Comparação dos Fragmentos RT- PCR.....	33
4.3. Análise da Expressão Temporal.....	41
4.3.1. Proteína Relacionada à Patogênese PvPR2	41
4.3.2. Proteína Quitinase.....	43
4.3.3. Proteína Glucanase.....	45
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	51

RESUMO

BORGES, Cynthia Maria de Oliveira, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Análise da expressão de genes envolvidos com a resposta de defesa do feijoeiro comum à ferrugem.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo, Sérgio Hermínio Brommonschenkel e Maurílio Alves Moreira.

A ferrugem do feijoeiro é uma doença que, no Brasil, causa sérios prejuízos à cultura do feijão, uma leguminosa de grande importância sócio-econômica, e pouco se sabe sobre a interação feijoeiro-*Uromyces appendiculatus*, fungo causador da ferrugem. No presente trabalho, utilizando-se linhagens de feijão quase isogênicas, resistente e suscetível à ferrugem, foram clonados fragmentos RT-PCR de cDNA homólogos a genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta de defesa na planta. Esses clones denominados PvPR2 e PvPR3 (proteínas relacionadas à patogênese 2 e 3), CHI (quitinase), GLU (glucanase), CHS (chalcona sintase), PAL (fenilalanina amônia-liase) e LOX (lipoxigenase), foram seqüenciados e utilizados como sondas em análises de expressão temporal. As cinéticas de expressão de três proteínas relacionadas à patogênese, PvPR2, quitinase e glucanase, foram analisadas durante a infecção por *U. appendiculatus* pela técnica de *Northern Blot*. A hibridização com a sonda PvPR2 apresentou expressão diferencial entre os indivíduos resistentes e suscetíveis, sendo que nos indivíduos resistentes a indução do gene para PvPR2 ocorreu mais

rapidamente do que nos indivíduos suscetíveis e em maior intensidade, sendo a diferença detectada de um intervalo de 6 h. Em muitos casos a diferença principal entre interações resistente e suscetível é a rapidez, e não a extensão, da expressão de genes envolvidos com a resposta de defesa. A hibridização com a sonda CHI demonstrou que nos indivíduos resistentes a sua expressão também iniciou-se mais cedo em relação aos indivíduos suscetíveis, como ocorreu com a sonda PvPR2, porém as maiores diferenças ocorreram com um intervalo de 24 h. A sonda GLU mostrou-se homóloga a uma endoglucanase básica, uma proteína intracelular. O resultado da hibridização sugere que não há uma expressão diferencial entre os indivíduos resistentes e suscetíveis, indicando que, provavelmente, o gene que codifica essa proteína é induzido por *U. appendiculatus*, mas a enzima não atua no processo de restrição de crescimento do fungo. Todos os cDNAs isolados neste trabalho poderão ser utilizados como sondas em bibliotecas genômicas e de cDNA para se obter os respectivos genes e cDNAs completos. Uma vez caracterizados, esses genes poderão ser utilizados em diversos estudos, inclusive em experimentos de transformação de plantas visando o aumento de tolerância a patógenos por super-expressão de um gene sabidamente envolvido com o processo de defesa.

ABSTRACT

BORGES, Cynthia Maria de Oliveira, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2001. **Defense related gene expression analysis in the common bean to rust.** Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Elza Fernandes de Araújo, Sérgio Hermínio Brommonschenkel and Maurílio Alves Moreira.

Bean rust is a disease which causes great losses to bean cultures, a leguminous species of great social-economic importance in Brazil. Little is known about the bean-*Uromyces appendiculatus* interaction, the latter being the rust causing fungus. In this work, RT-PCR fragments were amplified from cDNAs which were homologous to genes that encode proteins related to defense response in bean, using near isogenic lines, resistant and susceptible to rust. These probes were sequenced and named PvPR2 and PvPR3 (pathogenesis-related proteins 2 e 3), CHI (chitinase), GLU (glucanase), CHS (chalcone synthase), PAL (phenylalanine ammonia-lyase) e LOX (lipoxygenase). The expression kinetics of three pathogenesis-related proteins, PvPR2, chitinase and glucanase, during infection was analyzed by Northern blot. Hybridization with the PvPR2 probe showed differential expression between resistant and susceptible individuals. In resistant individuals induction of the PvPR2 gene was faster and more intense than in susceptible individuals, with the difference being detected in a 6-hour period. In many cases, the main difference between resistant and susceptible interactions was in the timing, and not extension of gene expression related to defense response. The Northern

blot result for the chitinase probe showed an early expression of the chitinase gene in resistant individuals compared to susceptible ones. That was also the case of the PvPR2 probe, however, in that case the time difference was of 24 hours. This difference is probably the reason for the successful defense mechanism which limits pathogen growth in resistant individuals. The glucanase probe was homologous to an intracellular protein, endoglucanase. The Northern blot result showed no differential expression between resistant and susceptible individuals, indicating that the endoglucanase gene might be induced by infection with *U. appendiculatus* but the endoglucanase enzyme will not act in restricting the pathogen. All probes isolated in this work can be used for probing genomic and cDNA libraries to obtain complete genes and cDNAs of interest. Once characterized, these genes will be useful in several studies, such as the increase in pathogen tolerance in transgenic plants showing overexpression of a gene induced during the plant defense response.

1. INTRODUÇÃO

O feijão é um alimento protéico amplamente consumido pela população brasileira, principalmente a de baixa renda, sendo o cultivo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) de grande interesse sócio-econômico. A sua produção é afetada severamente por doenças fúngicas, como ferrugem, antracnose e mancha-angular (VIEIRA, 1983). A ferrugem é causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, que apresenta grande variabilidade (HALEY et al., 1994). O cultivar de feijoeiro 'Ouro Negro' apresenta resistência a várias raças desse fungo (SARTORATO e RAVA, 1994).

Os fatores genéticos que atuam na interação do feijoeiro com *U. appendiculatus*, são pouco conhecidos do ponto de vista molecular, determinando limitações ao entendimento da relação planta-patógeno e à condução de programas de melhoramento do feijoeiro que visem sua resistência à ferrugem. O isolamento e caracterização de genes que codificam proteínas relacionadas à defesa da planta à patógenos tem-se mostrado importante instrumento em estudos dos mecanismos moleculares nos quais essas proteínas estão envolvidas (DIXON et al., 1996).

Proteínas relacionadas à patogênese são proteínas induzidas em plantas por estresse patológico, ou relacionado, que auxiliam no processo de restrição do crescimento do patógeno (STINTZI et al., 1993). Vários pesquisadores já analisaram o padrão de expressão de proteínas relacionadas à patogênese em muitas espécies vegetais, inclusive no feijoeiro, utilizando-se

principalmente suspensão de células tratadas com elicitores de fungos patogênicos (TEMPLETON e LAMB, 1988; LAMB et al., 1994; WALTER et al., 1990).

A demonstração dos padrões de expressão relacionados à resposta de defesa ainda não foi feita para a ferrugem do feijoeiro. Para isso, no trabalho proposto foram utilizadas linhas quase isogênicas (NIL), resistente e suscetível à doença, para coleta de material adequado para o estudo, visando analisar a cinética de expressão de genes envolvidos com a resposta de defesa do feijoeiro à ferrugem. Fragmentos RT-PCR de cDNA homólogos a genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta de defesa foram obtidos. Esses fragmentos foram clonados, seqüenciados e utilizados como sondas em experimentos de *Northern blot* para analisar sua expressão temporal durante a infecção com o patógeno causador da ferrugem.

Além da análise da expressão temporal desses genes, a utilização de seus respectivos fragmentos de cDNA como sondas em bibliotecas genômicas e de cDNA poderá permitir o isolamento e caracterização da seqüência completa de seus respectivos genes e cDNAs. Uma vez caracterizados, esses genes poderão ser utilizados em diversos estudos, inclusive em experimentos de transformação de plantas, como auxílio aos métodos de melhoramento tradicionais que visam aumento de resistência e/ou tolerância a patógenos em plantas.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

O objetivo do trabalho proposto foi o de avaliar a interação entre o feijoeiro e o agente causal da ferrugem (*U. appendiculatus*), analisando-se a expressão diferencial de genes que codificam proteínas envolvidas com defesa da planta a patógenos.

1.1.2. Objetivos Específicos

- 1) Inocular linhas quase isogênicas (NIL) de feijoeiro, oriundas do cruzamento entre os cultivares 'Ouro Negro' (resistente - R) e 'Rudá' (suscetível - S), com uredosporos e coletar as folhas em vários tempos após a inoculação.
- 2) Amplificar o cDNA sintetizado a partir de mRNA extraído de NIL R e S, infectadas com *U. appendiculatus*, utilizando-se os *primers* específicos para genes que codificam as proteínas: proteínas relacionadas à patogênese 2 e 3, glucanase, quitinase, chalcona sintase, fenilalanina amônia-liase, e lipoxigenase.
- 3) Clonar e seqüenciar os fragmentos RT-PCR específicos para os genes em estudo, e fazer a análise de identidade em bancos internacionais de seqüências, para serem utilizados como sondas.
- 4) Analisar a expressão gênica por *Northern blot* nos vários tempos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 36, 48, 96, 144, 192 e 240 horas) no material resistente e suscetível.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande importância econômica, sobretudo porque é uma planta cultivada, preferencialmente, por agricultores de pequeno e médio porte, constituindo alimento protéico básico para a classe de baixa renda no Brasil (BORÉM e CARNEIRO, 1998).

As pesquisas sobre o feijoeiro têm considerado três aspectos sobre a cultura: produtividade, resistência a doenças e qualidade do produto. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, ocupando a cultura mais de cinco milhões de hectares no país (BORÉM e CARNEIRO, 1998). Apesar disso, a produção nacional não é suficiente para o abastecimento do mercado interno. São produzidas pouco mais de três milhões de toneladas por ano e ainda é necessária a importação de 150 mil toneladas (AGRIANUAL, 1999). A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) recomenda uma produção de 47 Kg *per capita* ao ano em países em desenvolvimento, cuja população tenha o hábito de consumir o grão (AGRIANUAL, 1997). Apesar de alta, a produção brasileira *per capita*, está em torno de 21 Kg.

As perdas na cultura do feijão se devem, principalmente, a doenças e a chuvas na época da colheita, o que eleva o custo do produto colhido em relação ao custo normal de produção (AGRIANUAL, 1997). Embora a cultura do feijão no Brasil possua potencial para produzir 3.000 Kg/ha a produtividade média nacional está estacionada em torno de 620 kg/ha. Essa baixa produtividade tem como uma das principais causas o grande número de doenças que afetam o feijoeiro (RAMALHO e ABREU, 1998). VIEIRA (1983) cita mais de 30 doenças que podem atingir o feijoeiro, das quais cerca de oito são de maior importância no território nacional. Dentre essas está a ferrugem, cujo causador apresenta grande número de formas patogênicas especializadas ou raças fisiológicas, tornando seu controle mais complexo.

2.2. A Ferrugem e seu Controle

Uromyces appendiculatus é um fungo basidiomiceto, biotrófico e causador da doença ferrugem no feijoeiro comum (GROTH e OZMON, 1994). É um fungo macrocíclico apresentando no seu ciclo vital cinco estádios distintos, os quais ocorrem em um mesmo hospedeiro (ferrugem autóica). Apresenta reproduções sexuada e assexuada e possui estruturas especializadas para penetração e colonização. A formação do apressório é induzida por variações topográficas na superfície foliar e pelo diâmetro do estômato, por onde ocorre a penetração na folha (ALLEN et al., 1991). A retirada de nutrientes da planta pelo patógeno é feita por meio de haustórios (GROTH e OZMON, 1994).

O processo de infecção ocorre a temperaturas moderadas, entre 17 e 22°C, e umidade relativa de 95%. Como um dos sintomas da infecção observa-se manchas cloróticas, onde posteriormente desenvolvem pústulas circulares. Essas pústulas, de coloração marrom devido ao grande número de uredosporos, podem ou não exibir halo clorótico. Os uredosporos são produzidos mais intensamente nas pústulas localizadas na face abaxial da folha (PAULA Jr. e ZAMBOLIM, 1998).

Nos programas de melhoramento do feijoeiro comum, que visam obter cultivares resistentes à ferrugem, a identificação de raças fisiológicas do patógeno *U. appendiculatus* é fundamental. Mais do que 200 raças desse

patógeno já são conhecidas no mundo inteiro (STAVELY e PASTOR-CORRALES, 1991). A alta variabilidade genética do fungo (JUNQUEIRA NETTO et al., 1969; MORA-NUÑES, 1992; FALEIRO et al., 1999), acoplada à sua fácil mobilidade, constituem um problema ao controle da doença, especialmente em regiões de clima úmido.

As principais medidas de controle da ferrugem incluem o uso de variedades resistentes e o controle químico, sendo que a principal medida, sobretudo pela economia e pelo menor prejuízo ao ambiente, é o uso de cultivares resistentes (PAULA Jr. e ZAMBOLIM, 1998). Em 1983, durante o *The 1983 Bean Rust Workshop*, realizado em Porto Rico (STAVELY et al., 1983), foi estabelecida uma escala padrão para os tipos de reações da ferrugem. Nesse *workshop* também foram definidas as 20 variedades diferenciadoras (posteriormente reduzidas para 19) a serem utilizadas nos trabalhos de identificação de raças fisiológicas de *U. appendiculatus*. As diferenciadoras são: 'California Small White 643', 'Pinto 650', 'K.W.765', 'K.W.780', 'K.W.814', 'Golden Gate Wax', 'Early Gallatin', 'Redlands Pioneer', 'Ecuador 299', 'México 235', 'México 309', 'Brown Beauty', 'Pinto Olathe', 'AXS-37', 'NEP-2', 'Aurora', '51051', 'U.S.3' e 'CNC'.

Dentre os genes de resistência do feijoeiro à ferrugem e as variedades onde foram descritos tem-se: *Ur-3* ('Aurora', 'Ecuador 299', 'México 235', 'NEP-2' e '51051'); *Ur-4* ('Early Gallatin', 'Brown Beauty', 'K.W. 780'); *Ur-5* ('México 309'); *Ur-6* ('Pinto Olathe' e 'Golden Gate Wax'); *Ur-7* ('GN 1140'); *Ur-8* ('U.S.3'); *Ur-9* ('Pompador Checa 50'); *Ur-10* ('Cape' e 'Resisto'); *Ur-11* (PI 181996); *Ur-12* ('California Small White 643'); e *Ur-14* (PI 260418) (USDA, 2001).

Segundo FALEIRO et al. (1999) o cultivar 'Ouro Negro' foi resistente a quatro raças fisiológicas de *U. appendiculatus*, encontradas em MG. A resistência do cultivar 'Ouro Negro' às quatro raças testadas foi semelhante à resistência da linhagem americana 'BelMiDak-RR-3', a qual contém o gene *Ur-11*. FALEIRO et al. (1999) destacaram a importância da variedade 'Ouro Negro' como fonte doadora de genes de resistência em trabalhos de melhoramento. Além da resistência à ferrugem, outros aspectos como a

produtividade, resistência à antracnose e suas qualidades culinárias, recomendam o uso desta variedade em programas de melhoramento.

2.3. Interação Planta-Patógeno e Resistência

Melhoristas reconheceram, desde o início do século XX, que a resistência de plantas a doenças era controlada geneticamente, e desde então, conhecimentos sobre a base genética e bioquímica da resistência têm se acumulado. A gama de agentes fitopatogênicos que atacam as plantas é bastante diversa e inclui vírus, micoplasmas, bactérias, fungos, nematóides e protozoários (AGRIOS, 1988). Mesmo assim, resistência é a regra e suscetibilidade é a exceção, uma vez que a interação hospedeiro-patógeno se originou em um processo adaptativo entre a planta e o patógeno que a ataca, conduzindo a uma coevolução (KNOGGE, 1996).

A resistência ao patógeno é manifestada de várias maneiras, sendo, freqüentemente, relacionada com a resposta de hipersensibilidade (HR), caracterizada por morte localizada e induzida das células vegetais no local da infecção (reação necrótica). A HR é uma maneira de limitar o crescimento do patógeno, embora seu mecanismo molecular não tenha sido totalmente esclarecido. Sabe-se que mudanças fisiológicas comuns ocorrem na HR, em resposta a diferentes patógenos, incluindo uma rápida “explosão oxidativa” (*oxidative burst*), fluxos iônicos caracterizados por trocas $K^+ - H^+$, descompartmentalização celular, *crosslinking* e fortalecimento da parede celular, produção de fitoalexinas e indução de proteínas relacionadas a patogênese, como quitinases e glucanases (LAMB, 1994).

Acredita-se que HR e outras reações necróticas iniciem uma resposta subsequente, denominada de resistência sistêmica adquirida (SAR), que age de forma não específica na planta. SAR reduz a severidade da doença causada por todas as classes de patógenos, incluindo patógenos normalmente virulentos (RYALS et al., 1994). Muitas das respostas de defesa observadas em plantas resistentes, com exceção de HR, são também observadas em plantas suscetíveis, no entanto elas ocorrem mais tardiamente em relação ao processo de infecção (STASKAWICZ et al., 1995).

2.4. Base Genética da Resistência

FLOR (1947) propôs a existência de uma relação 'gene-a-gene' entre a patogenicidade do fungo *Melampsora lini*, causador da ferrugem do linho (*Linum usitatissimum* L.), e a reação do hospedeiro a esse patógeno. Apenas mais tarde, FLOR elucidou os mecanismos genéticos que controlam as interações entre hospedeiro e patógeno, fornecendo a base teórica para a hipótese 'gene-a-gene', que tenta explicar vários exemplos de interação planta-patógeno (FLOR, 1956 e 1971).

Nas interações do tipo 'gene-a-gene', a indução da resposta de defesa da planta, que conduz à HR, é iniciada pelo reconhecimento de moléculas sinalizadoras específicas (elicitors) produzidas pelo patógeno. Estes elicitors são codificados por genes de avirulência (*avr*) ou são produtos resultantes da ação de proteínas codificadas por genes *avr*. Os genes *R* seriam os genes que codificariam as proteínas receptoras desses elicitors. O reconhecimento do elicitor ativa uma série de genes da planta, processo que levaria à HR e à inibição do crescimento do patógeno (KEEN, 1990). O modelo receptor-ligante postula que os genes *avr* do patógeno especificam moléculas elicitoras que induzem o processo de resistência à doença na planta que contém o gene *R* correspondente (STASKAWICZ et al., 1995).

Verificou-se, posteriormente, que a hipótese 'gene-a-gene' aplica-se, também, a doenças causadas por bactérias, vírus e nematóides; sendo que para cada gene que confere resistência ao hospedeiro existiria um gene correspondente de avirulência no patógeno. Em geral, os genes para resistência são dominantes e os para suscetibilidade, recessivos. Enquanto que no patógeno, geralmente os genes para avirulência são dominantes e os para virulência, recessivos (AGRIOS, 1988).

O primeiro gene *R* de plantas a ser clonado, que se enquadra na relação gene-a-gene, foi o gene *Pto* de tomate (MARTIN et al., 1993), o qual confere resistência a linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que apresentam o gene de avirulência *avrPto* (RONALD et al., 1992). O gene *Pto* codifica uma proteína cinase serina/treonina, que atua na transdução de sinal ligada ao processo de resistência.

Outros genes *R* foram clonados, como o *RPS2* de *Arabidopsis*, que confere resistência a *P. syringae* pv. *tomato* e *P. maculicola* (BENT et al., 1994); o gene *N* de tabaco, que confere resistência ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) (WHITHAM et al., 1994); o gene *L6* de linho, que confere resistência ao fungo *Melampsora lini* (LAWRENCE et al., 1995); além de outros mais recentes. A partir de *primers* iniciadores específicos para regiões comuns e conservadas nesses três genes, KANAZIN et al. (1996), utilizando a técnica de PCR, identificaram em soja análogos de genes de resistência. Em feijão, RIVKIN et al. (1999), utilizando técnica semelhante, identificou oito classes de seqüências relacionadas a resistência a doenças.

Vários genes relacionados à resistência a doenças em plantas, já clonados, apresentam elevada homologia na sua seqüência primária e também conservação em *motifs* estruturais, quando comparados entre si (BENT, 1996). Assim, muitos estudos de interação planta-patógeno têm-se concentrado na clonagem e caracterização dessas seqüências conservadas, as quais podem auxiliar na identificação de novos genes ligados à resistência.

A clonagem molecular de genes *R*, que são responsáveis pela resistência de plantas a diversos patógenos, tem revelado que as proteínas codificadas por estes genes possuem algumas características estruturais em comum. Tais fatos sugerem que durante o processo evolutivo dos vegetais, mecanismos de transdução de sinal, comuns para processos de resistência a diferentes tipos de patógenos, podem ter surgido. A caracterização dos sinais moleculares envolvidos no reconhecimento do patógeno e dos eventos moleculares que especificam o mecanismo de resistência podem conduzir a novas estratégias para o controle de doenças em plantas, especialmente aquelas que utilizam a expressão de proteínas heterólogas na planta (STASKAWICZ et al., 1995).

2.5. Controle da Expressão de Genes Relacionados à Defesa

As evidências indicam que os genes de resistência apresentam expressão constitutiva (MARTIN et al., 1993), e os relacionados à defesa, em geral, são induzidos (DIXON et al., 1994; BOL et al., 1996). A presença da proteína receptora, mesmo que em pequena quantidade, é indispensável para

que o patógeno seja reconhecido e o processo de resistência se inicie. Da mesma forma, as proteínas envolvidas na defesa, mesmo que tenham outra função na célula vegetal, só teriam aumento no nível de transcrição de seu respectivo gene se isso fosse pertinente, evitando gasto de energia desnecessário para a célula. Em geral, os genes relacionados à defesa aumentam sua taxa de transcrição mais rapidamente e, em maior magnitude, em plantas resistentes do que nas suscetíveis (MEIER et al., 1993).

O controle da expressão de genes relacionados com a resposta de defesa ocorre, principalmente, na transcrição e na estabilidade do RNA mensageiro, segundo os estudos feitos até o presente (BISHOP et al., 2000). A etapa final na via de transdução de sinal que conduz à resistência é a interação de fatores de transcrição com os respectivos *cis*-elementos dos promotores de genes relacionados à defesa (DIXON et al., 1994). No sistema *avrPto-Pto* foram identificadas proteínas que interagem com a cinase serina/treonina codificada pelo gene *Pto* e que têm similaridade com fatores de transcrição. Essas proteínas, denominadas Pti4, Pti5 e Pti6, também assemelham-se aos elementos de ligação à proteína responsiva ao etileno, presente no tabaco. Nesta planta, esses elementos ligam-se a seqüências *PR-box* que estão conservadas em promotores de genes que codificam para várias proteínas relacionadas à patogênese (BENT, 1996). Em vários produtos de genes de resistência foram identificados motivos estruturais típicos de proteínas que se ligam ao DNA, como o zíper de leucina, o que evidencia que esses produtos podem ter uma função direta no controle da transcrição, atuando sob a forma de dímeros.

Em muitos organismos a expressão gênica pode ser controlada pela regulação da estabilidade do mRNA. Esse processo ocorre, geralmente, após a tradução, por meio de fosforilação de fatores que afetam a estabilidade do mRNA, por exemplo. ZHANG e METHDY (1994) identificaram uma proteína de 50 kDa (PRP-BP), que se liga ao mRNA do gene *PvPRP1* (proteína rica em prolina), em um domínio de 27 nucleotídeos ricos em uracila, na região não traduzida da extremidade 3'OH. A atividade da PRP-BP é aumentada *in vitro* pela presença de agentes redutores. Quando extratos de células são tratados com elicitor do fungo *C. lindemuthianum*, a atividade dessa proteína é

aumentada cinco vezes, o que conduz a uma rápida degradação do mRNA *PvPRP1*. ZHANG e METHDY (1994) afirmaram que PRP-BP pode atuar na desestabilização do mRNA do gene *Pv-PRP1*, induzida por um elicitador fúngico.

A atividade dos fatores de transcrição pode ser modificada por vários mecanismos após a sua síntese (HUNTER e KARIN, 1992). Um desses mecanismos é a fosforilação, que interfere na capacidade de ligação dos fatores ao DNA, a sua interação com outras proteínas envolvidas no processo de transcrição e a sua localização dentro da célula. A fosforilação de fatores seqüestrados no citoplasma ou a translocação mediada por proteína podem conduzi-los ao núcleo, onde atuam. Além disso, a atividade de ligação do fator de transcrição ao DNA pode ser modulada por fosforilação; e a fosforilação pode afetar a interação de domínios de transativação de fatores de transcrição com a maquinaria de transcrição.

2.6. Resposta de Defesa no Feijoeiro

A resposta metabólica de plantas ao ataque de patógenos, a tratamentos químicos e injúria mecânica ou causada por insetos é caracterizada por uma rápida e específica acumulação de numerosos polipeptídeos (LAMB, 1994). Dentre os transcritos que acumulam durante a resposta de defesa estão os que codificam enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas antimicrobianas, lignina e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (proteínas de parede celular), além de inibidores de proteases. Mudanças nos níveis de mRNA de tais proteínas são decorrentes de ativação de transcrição, sendo possível que exista um nível basal de transcrição e tradução desses genes na ausência da interação planta-patógeno, principalmente na incompatível (DIXON et al., 1994).

Durante a resposta de defesa também ocorre a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR). Dentre estas, as de maior interesse são as que apresentam atividade hidrolítica, como quitinases e glucanases, por restringirem o crescimento do patógeno. Muitas PR ainda não têm sua função conhecida.

Em vários estudos moleculares sobre a resposta de defesa, células de feijoeiro em suspensão têm sido tratadas com um elicitador do fungo causador da

antracnose, *Colletotrichum lindemuthianum*, para ativar a resposta de defesa (LAMB, 1994). Esse elicitor constitui uma fração da parede celular desse fungo patogênico. Nesses experimentos verificou-se indução de enzimas da via biossintética de fitoalexinas (DRON et al. 1988), glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, que fazem parte da parede celular vegetal (CORBIN et al., 1987), quitinases (HEDRICK et al., 1988) e enzimas envolvidas na formação de monômeros de lignina (WALTER et al., 1988).

Em tecidos infectados com *C. lindemuthianum*, a extensão da degradação da pectina pela endopoligalacturonase (PG) fúngica é controlada por uma proteína associada à parede celular que é inibidora dessa enzima. A proteína inibidora de PG (PGIP) é extracelular e possui domínios LRR (*leucine rich repeat*) (CERVONE et al., 1989). NUSS et al. (1996) demonstraram que ocorre acúmulo de mRNA para PGIP como resposta à inoculação da raça 9 (gama) de *C. lindemuthianum* nas linhagens contendo gene *Are*, apesar desse gene não conferir resistência à essa raça. Esse acúmulo é 20 vezes maior do que o nível basal e tem seu pico 40 h após a inoculação (4 h antes de ocorrer HR), retornando ao nível basal 68 h depois. Nesse período, nenhum aumento é observado nas linhagens suscetíveis. Dessa forma, esse acúmulo estaria associado com a HR na interação de *P. vulgaris* com a raça 9 de *C. lindemuthianum*.

2.6.1. Proteínas Relacionadas à Patogênese

Uma classe heterogênea de proteínas, denominadas proteínas relacionadas à patogênese (PR), é encontrada em uma variedade de plantas, sendo sintetizadas em resposta a infecção viral, fúngica ou bacteriana, além de injúria mecânica ou estresse químico (CARR e KLESSING, 1990; VAN LOON et al., 1994). Devido à falta de informação sobre a função de tais proteínas, elas foram inicialmente definidas como polipeptídeos de pequena massa molecular, solúveis em pH baixo, que apresentam pontos isoelétricos extremos e resistência à degradação proteolítica, além de se acumularem extracelularmente no tecido infectado (VAN LOON et al., 1994). Entretanto, as propriedades de muitas proteínas PR não se enquadram na maioria desses

critérios, sendo essas proteínas divididas em classes, de acordo com suas características bioquímicas. Apesar de muitas PR não terem função conhecida, duas classes dessas proteínas são as que apresentam atividade de quitinase ou glucanase.

PvPR1 e PvPR2:

WALTER et al. (1990) identificaram duas proteínas relacionadas à patogênese, PvPR1 e PvPR2, comparando o padrão de expressão gênica de uma cultura de células de feijoeiro cv. 'Canadian Wonder' tratada e outra não tratada com um elicitor fúngico de *C. lindemuthianum*. As células que entraram em contato com o elicitor apresentaram uma classe abundante de pequenos mRNAs, rapidamente induzidos.

Utilizando a técnica de hibridização diferencial, os autores conseguiram selecionar seis cDNAs de tamanho correspondente aos mRNAs induzidos pelo tratamento com o elicitor. Os clones positivos foram divididos em duas classes de proteínas relacionadas à patogênese, PvPR1 e PvPR2, de acordo com a análise da seqüência nucleotídica dos cDNAs, o que permitiu definir diferenças nas regiões 3' e 5' não traduzidas dos respectivos mRNAs. Além disso, a diferença na cinética de indução dos respectivos mRNAs (PvPR2 é induzida mais tardiamente) auxiliou na divisão das classes.

As seqüências de aminoácidos deduzidas dos clones de cDNA correspondentes a PvPR1 e PvPR2 (156 e 155 resíduos de aminoácidos, respectivamente) apresentaram alta homologia entre si, cerca de 89%. As duas proteínas possuem massa molecular em torno de 16 KDa e são ácidas. A análise por *Southern blot* demonstrou uma organização altamente complexa dos genes que codificam PvPR1 e PvPR2 no genoma do feijoeiro, estimando-se um número de cópias de pelo menos 12 genes (WALTER et al., 1990). Esse mesmo autor, em 1996, verificou que esse número pode chegar a 20 genes (WALTER et al., 1996).

PvPR3:

SHARMA et al. (1992) descreveram a estrutura e expressão de um novo gene que codifica uma PR de feijão, designada PvPR3. A partir de uma biblioteca de cDNA, originada de suspensão de células de feijoeiro tratadas

com um elicitor fúngico de *C. lindemuthianum*, foi isolado um clone de cDNA correspondente ao mRNA de PvPR3.

Os autores observaram um acúmulo gradual do mRNA correspondente a PvPR3 muitas horas após o tratamento das células com o elicitor. O transcrito PvPR3 estava presente em células não tratadas, mas uma hora após o tratamento com o elicitor o nível do mRNA aumentou significativamente. Após 24 h, o nível do mRNA correspondente a PvPR3 era 3,5 vezes maior que o das células não tratadas.

Esses padrões de expressão foram comparados com os previamente descritos para genes de proteínas PR (PvPR1 e PvPR2) tanto quanto para outros genes ativados durante a resposta de defesa no feijoeiro (WALTER et al., 1990).

A ORF (*Open Reading Frame*) do cDNA isolado, correspondente a PvPR3, codifica potencialmente uma seqüência de 137 resíduos de aminoácidos, sendo estimada uma proteína de massa molecular de 14,95 KDa. Além disso, PvPR3 é fortemente básica, especialmente rica em alanina (15%) e arginina (11%), apresentando um pI (ponto isoelétrico) próximo de 10,0. Dados de *Southern blot* indicaram que PvPR3 existe como cópia única de um gene pertencente a uma família multigênica divergente, que consiste de aproximadamente 15 membros (SHARMA et al., 1992).

A proteína PvPR3 provavelmente se acumula no citoplasma, já que um peptídeo sinal hidrofóbico não foi observado. Esse fato também é observado com proteínas PR de função desconhecida estudadas em batata (MATTON e BRISSON, 1989) e feijão (WALTER et al., 1990), que por isso apresentam provável localização intracelular.

O acúmulo de longa duração do mRNA para PvPR3 em células tratadas com o elicitor sugere que essa proteína possa agir em estádios mais tardios da resposta de defesa a patógenos, o que poderia complementar o mecanismo inicial de defesa.

2.6.2. Proteínas Hidrolíticas Relacionadas à Defesa

Quitinases e glucanases induzidas em plantas como resposta a estresse têm sido descritas em várias espécies de plantas cultivadas, tanto em

mono quanto em dicotiledôneas. Estas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise de quitina e glucano, dois polímeros estruturais, encontrados em paredes celulares de vários fungos (SCHLUMBAUM et al., 1986).

Um possível papel para estas enzimas hidrolíticas na defesa contra infecção fúngica foi primeiro sugerido por observações de que uma quitinase induzida coordenadamente com uma 1,3-beta-glucanase, ambas isoladas de feijoeiro, apresentavam forte efeito antifúngico *in vitro* (MAUCH et al., 1988a e 1988b), o que também sugeriu um sinergismo entre essas proteínas. Ambas as enzimas são fortemente induzidas por etileno em folhas de feijoeiro (MAUCH e STAEHELIN, 1989; VOGELI et al., 1988).

Quitinase:

De TAPIA et al. (1986 e 1987) estudaram a tradução *in vitro* de um mRNA correspondente a uma quitinase ácida, denominada PR4, induzida no feijoeiro após tratamento com solução de cloreto de mercúrio e após infecção com vírus do mosaico da alfafa. Analisando as propriedades bioquímicas da proteína, verificou-se que esta possui localização extracelular, é resistente a proteases endógenas, contém uma alta proporção de aminoácidos ácidos e é solúvel em pH baixo. Além disso, é sintetizada como um precursor maior, fato esperado para proteínas que são sintetizadas no retículo endoplasmático e transportadas através da membrana plasmática. A isoforma básica dessa enzima, também presente no feijoeiro, está localizada no vacúolo (MARGIS-PINHEIRO et al., 1991).

De TAPIA et al. (1986) demonstraram que o mRNA funcional dessa enzima está presente apenas em plantas sob estresse químico ou infectadas por patógenos, sugerindo síntese *de novo* para a mesma, estando a regulação de sua síntese envolvida com o acúmulo de seu mRNA funcional.

MARGIS-PINHEIRO et al. (1991), a partir de uma biblioteca de cDNA de folhas de feijoeiro cv. 'Casa', tratadas por 3,5 h com solução de cloreto de mercúrio, isolaram o cDNA que codifica para a quitinase ácida PR4, induzida durante o estresse químico. Análise de *Southern blot*, utilizando como sonda o clone de cDNA correspondente a quitinase PR4, revelou que, provavelmente, existe um único gene codificando esta enzima no genoma do feijoeiro (MARGIS-PINHEIRO et al., 1991).

Glucanases:

EDINGTON et al. (1991) isolaram um cDNA completo, correspondente a uma 1,3-beta-D-glucanase, a partir de uma biblioteca de cDNA originada de células de feijoeiro em suspensão, tratadas com elicitor fúngico de *C. lindemuthianum* por 38 h. Analisando a estrutura primária da enzima, os autores concluíram que essa é uma endo-1,3-beta-D-glucanase básica. O cDNA foi traduzido em um polipeptídeo com um pI estimado de 9,35, similar ao pI da principal forma de glucanase de feijão (MAUCH e STAEHELIN, 1989).

Essa principal forma de 1,3-beta-D-glucanase é um polipeptídeo básico com massa molecular de 36.000 (MAUCH e STAEHELIN, 1989; VOGELI et al., 1988). Duas beta-glucanases ácidas, pouco menores em massa, são antigenicamente relacionadas à enzima básica, tendo sido detectadas em pequenas quantidades em folhas de feijoeiro infectadas por vírus ou tratadas com cloreto de mercúrio, mas não em tratamento com etileno (AWADE et al., 1989). Em tabaco, as atividades da glucanase vacuolar (isoforma básica) e da glucanase localizada na parede celular (isoforma ácida) são claramente distintas uma da outra, em relação a sua regulação durante a defesa induzida (VAN DEN BULCKE et al., 1989).

EDINGTON et al. (1991) também demonstraram por análise de *Southern blot* que 1,3-beta-D-glucanase básica parece ser codificada por um único gene, tendo organização genômica similar em vários cultivares de feijoeiro, como 'Canadian Wonder', 'Imuna' e 'Saxa'.

2.6.3. Enzimas de Vias Biossintéticas Relacionadas à Resposta de Defesa

Uma característica peculiar do desenvolvimento vegetal é a capacidade que as plantas têm de dar respostas adaptativas e protetoras a diversos estresses ambientais. Os compostos flavonóides naturais são de particular importância nessas respostas, já que possuem diversas funções no desenvolvimento da planta e interações com o ambiente. Dentre estes compostos estão lignina (polímero estrutural da parede celular), que também age como um protetor contra injúria e barreira a infecções, pigmentos

flavonóides e protetores de luz ultravioleta, tanto quanto isoflavonóides e antibióticos fitoalexinas (BELL, 1981; DIXON et al., 1983).

Chalcona sintase:

A enzima chalcona sintase (CHS) catalisa a primeira etapa na via ramificada do metabolismo específico para biossíntese de flavonóides, condensando três unidades acetil de malonil-CoA com 4-hidroxicinamoil-CoA, o que resulta em naringenina chalcona (HELLER e HAHLBROCK, 1980).

Em feijão e outras leguminosas, mRNAs que codificam CHS são, caracteristicamente, induzidos por injúria, elicitor fúngico ou infecção, o que está associado à síntese de pterocarpano e fitoalexinas derivadas de precursores isoflavonóides (LAMB, 1994).

RYDER et al. (1987) demonstraram a organização dos genes que codificam CHS no feijoeiro, além do padrão de ativação desses genes em resposta a sinais ambientais. Esses autores verificaram que existem pelo menos 6 diferentes genes para CHS no genoma do feijoeiro e alguns estão intimamente ligados. Também demonstraram que tais genes exibiram regulação diferencial complexa, em termos da cinética e extensão da indução em resposta a elicitor fúngico, além do padrão de indução por injúria e infecção.

Vários clones de cDNA com seqüências complementares ao mRNA de CHS têm sido identificados a partir de células de feijão irradiadas ou tratadas com elicitor fúngico (KREUZALER et al. 1983, RYDER et al., 1984). Esses clones foram usados para demonstrar que tais estímulos ativam a transcrição de genes para CHS, conduzindo a um acúmulo de seu mRNA e dos níveis da enzima, o que aumenta a quantidade de pigmentos isoflavonóides e fitoalexinas (LAWTON e LAMB, 1987).

Fenilalanina amônia-liase:

Fenilalanina amônia-liase (PAL) é uma enzima chave do metabolismo vegetal, catalisando a primeira reação na biossíntese de L-fenilalanina a partir de uma grande variedade de produtos naturais que possuam o esqueleto fenilpropanóide. Esta enzima pode ser estimulada por vários fatores, inclusive por infecção de patógenos, conduzindo a síntese de compostos do grupo das

ligninas, compostos fenólicos ligados à parede e fitoalexinas derivadas de fenilpropanóides (JONES, 1984).

Aumentos significativos na síntese de fenilalanina amônia-liase e do seu mRNA funcional têm sido observados em resposta à infecção ou tratamento com elicitor, em um grande número de sistemas (CRAMER et al. 1985; GAUDET et al., 2000).

EDWARDS et al. (1985) trataram uma suspensão de células de feijão com um elicitor oriundo da parede celular do fungo *C. lindemuthianum*. Os autores verificaram um rápido aumento na taxa de síntese de PAL e em, pelo menos, três outras enzimas envolvidas na biossíntese de fenilpropanóides. Esse aumento foi simultâneo ao acúmulo de material fenólico ligado à parede celular e fitoalexinas flavonóides. EDWARDS et al. (1985) isolaram um clone de cDNA correspondente a PAL e o chamaram de PAL 5.

Por análise de *Northern blot* verificou-se que o mRNA correspondente à proteína PAL apresentou um rápido acúmulo após o tratamento com o elicitor, enquanto esteve quase ausente nas células não tratadas. O acúmulo máximo ocorreu 3 a 4h após o tratamento, decaindo rapidamente a baixos níveis após esse período. Esse rápido aumento nos níveis basais, sugere que o elicitor estimula a síntese do mRNA para PAL.

A cinética do mRNA de PAL induzido pelo elicitor é bastante relacionada à observada para o mRNA de chalcona sintase, a qual catalisa a primeira reação na via ramificada do metabolismo de fenilpropanóides, específica para a biossíntese de flavonóides e isoflavonóides (RYDER et al., 1984).

Lipoxigenase:

Lipoxigenase (LOX) é uma dioxigenase que contém um átomo de ferro não-hêmico, sendo de ocorrência geral em eucariotos. Essa enzima catalisa a hidroperoxidação de ácidos graxos insaturados que contém um grupo *cis*-1,4-pentadieno. Os ácidos linoléico e linolênico, comuns em fosfolípídeos de membranas vegetais, são substratos de LOX (EIBEN e SLUSARENKO, 1994).

Acredita-se que mecanismos que danificam a membrana, por geração de espécies de oxigênio ativo ou por dano enzimático direto, estejam envolvidos no processo de HR (SLUSARENKO et al., 1991). Estudos

bioquímicos com feijão mostraram claramente que a peroxidação dos ácidos graxos da membrana, que ocorre durante a resposta de hipersensibilidade (HR), é mediada por atividade de LOX e está sob controle metabólico, não sendo resultado de auto-oxidação (CROFT et al., 1993).

A HR constitui uma necrose rápida no tecido vegetal atacado por um isolado avirulento de um determinado patógeno, resultando no processo de resistência (interação incompatível). Esse tipo de morte celular programada parece depender da síntese de proteínas do hospedeiro e não de algum composto tóxico do patógeno (MEIER et al., 1993).

KEPPLER e NOVACKY (1986) demonstraram que durante a HR ocorre peroxidação de lipídeos da membrana. Além disso, aumento na atividade enzimática de LOX tem sido observado em várias interações incompatíveis (SLUSARENKO et al., 1991 e 1993). Esses mesmos autores verificaram, em feijão, que a atividade de LOX aumentou durante a HR e postularam que LOX talvez agisse em conjunto com uma hidrolase acil lipolítica, podendo causar danos à membrana (CROFT et al., 1990; SLUSARENKO et al., 1991). Os hidroperóxidos dos ácidos graxos formados a partir da atividade de LOX, ou seus metabólitos, levariam à síntese de moléculas sinalizadoras que poderiam coordenar as respostas de defesa da planta (FARMER e RYAN, 1992) e produzir substâncias que poderiam inibir diretamente a ação do patógeno (CROFT et al., 1993).

MEIER et al. (1993) clonaram e caracterizaram um cDNA de LOX de feijão, denominado LOX3, e o usaram para investigar a indução temporal e espacial do mRNA correspondente em lesões (e ao redor das mesmas) de HR, induzidas pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Eles verificaram que os transcritos para LOX se acumularam, predominantemente, nas regiões em redor das lesões, cerca de 14 h após a inoculação.

Em folhas de tomate infiltradas a vácuo com células de *Pseudomonas*, a indução da atividade de LOX, aumento na síntese de seu mRNA e da proteína sofreram modificações que correlacionaram com o estabelecimento da HR (KOCH et al., 1992). Mudanças coordenadas similares foram demonstradas em outros pato-sistemas, como *Arabidopsis* - *Pseudomonas* (MELAN et al., 1992).

EIBEN e SLUSARENKO (1994) estudaram a expressão temporal e espacial de genes de LOX durante o desenvolvimento de *P. vulgaris*. Eles compararam a expressão do membro *LOX1*, pertencente à família de LOX de feijão, ao padrão de expressão geral de genes de LOX relacionados. Transcritos de *LOX1* não acumularam em folhas em resposta a metil jasmonato ou a inoculação com patógeno, apesar destes tratamentos causarem acúmulo de outros transcritos para LOX.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Genético

Os cultivares mesoamericanos 'Ouro Negro' e 'Rudá' são contrastantes quanto à resistência a uma mistura de raças do patógeno causador da ferrugem, o fungo *U. appendiculatus*, sendo 'Ouro Negro' resistente à doença e 'Rudá' suscetível (FALEIRO et al., 1996).

Neste trabalho foram utilizadas linhas quase-isogênicas (*Near Isogenic Lines* - NIL) do tipo 'Rudá', resistentes e suscetíveis à ferrugem. O desenvolvimento dessas NIL foi iniciado no Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO-UFV-EPAMIG, a partir do cruzamento entre 'Ouro Negro' (genitor doador) e 'Rudá' (genitor recorrente), seguido de retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares (FALEIRO et al., 1996).

As NIL contrastantes para a resistência utilizadas nos experimentos de inoculação estavam no terceiro retrocruzamento (RC₃), já tendo sido autofecundadas de três a quatro vezes (F₃RC₃ e F₄RC₃). Segundo FALEIRO et al. (2000) estas linhas apresentaram distância genética entre si igual a zero (alto grau de isogenia), constituindo-se em um excelente material para análise da expressão diferenciada em plantas resistentes e suscetíveis como resposta à infecção com *U. appendiculatus*.

3.2. Inoculação das Plantas e Coleta das Folhas para Extração de RNA Total

O patógeno *U. appendiculatus* é mantido sob a forma de uredosporos na Micoteca do BIOAGRO/UFV. A raça fisiológica 6 de *U. appendiculatus* (FALEIRO, 1997) foi utilizada neste trabalho, em uma concentração de 8,0 x 10⁴ uredosporos/mL. A suspensão de uredosporos foi preparada em água destilada contendo 0,05% de detergente *Tween* 20 e um hemacitômetro foi utilizado para estimar a concentração de uredosporos.

As proteínas envolvidas na resposta de defesa em plantas, em geral, são induzidas pelo patógeno ou estresse ambiental. Dessa forma, o ambiente pré e pós inoculação deve ser bastante controlado, para que não ocorra indução dos genes em estudo por outro motivo que não a infecção com o patógeno. As sementes foram germinadas em solo adubado com NPK (4-14-8), contido em bandejas plásticas, e mantidas sob um fotoperíodo de

12 h e temperatura ambiente em torno de 22 a 24°C. As plantas ficaram na casa de vegetação do Departamento de Microbiologia/ UFV, onde acredita-se que a fonte de inóculo seja mais baixa, quando comparada com as casas de vegetação disponíveis, nas quais o feijoeiro é plantado normalmente.

Aproximadamente dez dias após o plantio, com o auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, as folhas primárias das NIL resistente e suscetível foram inoculadas com a suspensão de uredosporos, para posterior extração de RNA e síntese de cDNA. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em uma câmara úmida com temperatura em torno de 20°C e umidade relativa do ar superior à 95%. Um mesmo número de plantas dessas NIL não foi inoculado, constituindo o controle negativo. Apenas uma das folhas primárias de cada planta foi coletada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até a extração do RNA. A outra folha foi deixada na planta para confirmar o tipo de interação com *U. appendiculatus*.

A coleta do material foi feita a diferentes intervalos de tempo após a inoculação (0, 6, 12, 24, 36, 48, 96, 144, 192 e 240 horas), sendo que em cada tempo foram coletadas folhas primárias de quatro plantas de cada um dos quatro materiais (NIL resistente inoculada e não inoculada; e NIL suscetível inoculada e não inoculada), que foram armazenadas individualmente.

O tempo zero e o material não inoculado constituem os controles do experimento. As plantas permaneceram na casa de vegetação até o desenvolvimento dos sintomas típicos da doença, que apareceram em torno de quinze dias após a inoculação.

3.3. Extração de RNA Total

O RNA total foi extraído das folhas coletadas, pelo método do isotiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987), porém com algumas adaptações ao protocolo original. Devido ao grande número de amostras (40 amostras), foi desenvolvido um protocolo rápido e eficiente para extração de RNA total baseado no protocolo do reagente comercial *Trizol*, da empresa *Life Technologies*. Todas as etapas de extração do RNA total foram efetuadas a 4°C e em condições livres de ribonuclease (RNase). O protocolo modificado é descrito a seguir.

Cerca de 500 mg de folha de cada amostra, foram macerados em nitrogênio líquido. A cada amostra foram adicionados 3 mL de tampão de extração (isotiocianato de guanidina 4 mol/L; lauril sarcosinato de sódio 0,5 %; β -mercaptoetanol 100 mmol/L e citrato de sódio 25 mmol/L, pH 7,0); 300 μ L de acetato de sódio 2 M, pH 4,0; e 2 mL de fenol saturado em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Após agitação em *vortex*, as amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos, para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de clorofórmio, sendo as amostras novamente agitadas e mantidas no gelo por mais 5 minutos. As fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação a 10.000 g por 20 minutos. A fase aquosa foi novamente misturada com igual volume de clorofórmio, e depois, o RNA foi precipitado adicionando-se 375 μ L de isopropanol e 375 μ L de solução salina (0,8 mol/L de citrato de sódio e 1,2 mol/L de cloreto de sódio), que impede a precipitação de polissacarídeos. Após 10 minutos à temperatura ambiente, o RNA foi coletado por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos. O precipitado foi lavado em etanol 75%, ressuspenso em 50 μ L de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C até o uso.

A integridade do RNA total isolado foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo. A presença de duas bandas bem distintas, indica a preservação dos RNA ribossômicos 18S e 28S, forte indício de que não há degradação apreciável das amostras de RNA.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro a 260 nm (SAMBROOK et al., 1989). Os valores confiáveis de absorbâncias a 260 nm devem ser acima de 0,1 e a relação A_{260}/A_{280} ideal deve estar entre 1,8 e 2,0, indicando que não há contaminação significativa por proteínas, guanidina ou fenol residuais, que podem inibir a transcrição reversa do RNA. A concentração de RNA foi estimada pela fórmula: $[\text{RNA}]\mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} * f * 40) / 1000$, onde f é o fator de diluição.

3.4. Síntese da Primeira Fita de cDNA

A fita de cDNA inicial foi sintetizada pela enzima transcriptase reversa, a partir de RNA total, utilizando o kit *Super Script™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*, da *Life Technologies*, que se baseia no protocolo

de SOKOLOV e PROCKOP (1994). O método de iniciação da primeira fita de cDNA empregado foi o que utiliza o *primer* oligo-dT₁₂₋₁₈, que pareia à cauda poli A+, presente na maioria dos mRNAs eucarióticos.

A transcrição reversa do mRNA poli A⁺ foi realizada em reações de 20 µL, contendo: 2,5 a 5 µg de RNA Total tratado com a enzima *RQI DNase I* (*Promega*); 0,5 µg de *primers* oligo-dT₁₂₋₁₈; desoxinucleosídeos trifosfatados 500 µM de cada; MgCl₂ 2,5 mM; ditioneitol (DTT) 5 µM; e 200 unidades de transcriptase reversa. Inicialmente, o *primer* e o RNA total sofreram uma desnaturação a 70°C por 10 min. Em seguida foram acrescentados os demais componentes da reação, que foi mantida a 42°C por 50 min, para ocorrer a transcrição reversa, e depois a 70°C por 15 min, para a inativação da enzima. Finalmente, após adição de quatro unidades de Ribonuclease H, que degrada a fita de mRNA do híbrido cDNA:mRNA, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Como o RNA total pode conter pequenas quantidades de DNA genômico que podem ser amplificados com o cDNA alvo, para cada reação foi feito um controle sem transcriptase reversa (RT-). Esse procedimento permitiu avaliar o sucesso do tratamento com a DNase I e determinar se um dado fragmento foi originado a partir do DNA genômico ou da população de cDNA.

A técnica de RT-PCR foi utilizada para obter fragmentos de cDNA específicos para os genes cuja expressão está sendo estudada nesse trabalho. Esses fragmentos foram utilizados como sondas nos experimentos de *Northern blot*. A população de cDNAs que foi amplificada para a obtenção das sondas homólogas pertence ao tratamento da NIL resistente e inoculada, cuja folha foi coletada 48 h após inoculação.

3.5. Construção dos *Primers* Específicos

Primers específicos foram construídos a partir de seqüências depositadas no *GenBank*, que representam cDNAs de várias proteínas do feijoeiro que podem estar envolvidas em resposta de defesa a patógenos e/ou injúrias. O programa utilizado para a construção dos *primers* foi o *Primer3 Input Program*, que está disponível no endereço eletrônico: <http://www->

genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.html (ROZEN, e SKALETSKY, 1998). Esse programa permite a escolha do tamanho do fragmento a ser amplificado, o número de nucleotídeos dos *primers*, além de fornecer o par de *primers* com melhor desempenho nas condições iônicas às quais eles serão submetidos.

TABELA 1: Informações sobre os *primers* específicos utilizados nesse trabalho.

Proteínas do feijoeiro relacionadas à defesa	Seqüência dos <i>primers</i> específicos	Acesso no <i>GenBank</i> (cDNA/proteína correspondente)	Tamanho da seqüência de cDNA depositada no <i>GenBank</i>	Tamanho esperado para o fragmento RT-PCR	Referência da seqüência do cDNA de origem
Proteína relacionada à patogênese PVPR2	PVPR2-L: ATGGSTGTTTTACATTCGAG PVPR2-R: AGGATTGGCCAAAAGGTAAG	X61364/ P25986	---	465pb	WALTER et al., 1990
Proteína relacionada à patogênese PVPR3	PVPR3-L: CTCAGAAGGCGCAGAAAAC PVPR3-R: TCAGACCTTCAGATCTTCG	M75856/ ---	422 pb (ORF)	410 pb	SHARMA et al., 1992
Quitinase	CHI-L: TTGCAGCATTGTCACAGCA CHI-R: CACCATTGATGGCTCTGATG	X57187/ P27054	977 pb	501 pb	MARGIS-PINHEIRO et al., 1991
Glucanase	GLU-L: CAAGGCCTCCATGATCAAAT GLU-R: TTCTCATCGAACATGGCAAA	X53129/ P23535	1158 pb	503 pb	EDINGTON et al., 1991
Chalcona sintase	CHAL-L: GCGAGGCAAGACATAGTGGT CHAL-R: TTCACGAAGGTGACCATCAA	X06411/ P49440	1342 pb	504 pb	RYDER et al., 1987
Fenilalanina amônia-liase	PAL-L: GAAGTGATGCAAGGGAAACC PAL-R: TTCAGCTCCCTTGAAACCAT	M11939/ P07218	1067 pb	504 pb	EDWARDS et al., 1985
Lipoxigenase	LOX-L: GGAAGTGTCCGCTGTGATTT LOX-R: TCTGGGTTCTTAGCCAATGC	X63521/ P27481	2226 pb	501 pb	MEIER et al., 1993

Na Tabela 1 temos as seqüências dos *primers* específicos para cada um dos genes de interesse no trabalho, bem como as informações sobre as seqüências depositadas no *GenBank* (cDNA e proteína correspondente) utilizadas para a construção dos *primers*. O tamanho do produto RT-PCR esperado para cada par de *primers* também está contido na Tabela 1.

3.6. Amplificação e Separação dos Fragmentos RT-PCR

Para cada par de *primers* foram otimizadas as condições da reação de PCR. A primeira fita de cDNA foi amplificada em uma mistura de reação de 25 µL contendo: 1 µL da solução de cDNA obtido a partir da transcrição reversa com *primer* oligo-dT; 1 unidade de Taq DNA polimerase; dNTP 200 µM de

cada; $MgCl_2$ 1,5 μM ; e 7,5 pmoles de cada um dos *primers* específicos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *PE Applied Biosystems*, modelo 9600. Para os *primers* CHS, CHI, GLU, PAL e PvPR2 as condições de amplificação foram: um passo de 94°C por 3 min; trinta e cinco ciclos a 94°C por 30 s, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min; e um passo final a 72°C por 7 min.

Para os *primers* PAL e PvPR3 o programa utilizado foi do tipo *touchdown*: um passo de 94°C por 3 min; dez ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 1 min (decaimento de 1°C a cada ciclo até atingir 51°C), e 72°C por 1 min; vinte e cinco ciclos a 94°C por 30 s, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min; e um passo final a 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%, com tampão TBE 1X (tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM), utilizando-se brometo de etídeo na concentração de 1 μg / 50 mL de gel. As bandas foram visualizadas sob luz UV e os fragmentos foram purificados do gel utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction kit (250)* (QIAGEN), e armazenados a -20 °C até o momento de uso.

3.7. Clonagem, Seqüenciamento e Análise dos Fragmentos

Os fragmentos amplificados pelos *primers* específicos, e já purificados, foram ligados ao vetor plasmidial pGEM-T com auxílio do *kit pGEM-T Easy* (Promega) e transformados em *Escherichia coli*, linhagem DH5 α ou JM109, utilizando o método de transformação descrito por COHEN et al. (1972). As colônias selecionadas por α -complementação foram confirmadas por PCR - direto das colônias, com os *primers* universais M13. O DNA plasmidial dos clones que geraram padrões PCR esperados foram clivados com a enzima de restrição *Eco RI* e submetidos à eletroforese para confirmação do tamanho dos fragmentos clonados.

Os clones confirmados foram seqüenciados pelo método de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs), descrito por SANGER et al. (1977). As reações consistiram de amplificação linear por PCR, utilizando-se o *kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Seqüencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). O programa de amplificação apresentou um período inicial de

desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos a 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos, e 60°C por 4 minutos. O seqüenciamento dos fragmentos de cDNA foi feito em seqüenciador automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

As seqüências obtidas foram montadas em contíguos e analisadas usando-se o programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.). A comparação com outras seqüências depositadas no *GenBank*, foi feita utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) do *National Center for Biotechnology Information -NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os clones que apresentaram similaridade com as seqüências de cDNA correspondentes às proteínas em estudo foram utilizados como sondas homólogas em experimentos de *Northern blot*.

3.8. Análise da Expressão Temporal Específica por *Northern blot*

Neste trabalho, a técnica de *Northern blot*, descrita originalmente por ALWINE et al. (1977, 1979), foi utilizada para estimar a cinética de acúmulo dos mRNAs correspondentes às proteínas relacionadas à defesa, nas NIL resistente e suscetível, em vários tempos após a inoculação com o patógeno. O protocolo utilizado para essa técnica foi o descrito por SAMBROOK et al. (1989), com as devidas adaptações para hibridização de cada sonda. A sonda normalizadora foi um fragmento de cDNA de actina de milho, proteína que apresenta expressão constitutiva.

3.8.1. Transferência do RNA Total e sua Fixação à Membrana

As amostras de RNA total (10-15 µg) das NIL resistente e suscetível, inoculadas ou não, foram fracionadas em gel de agarose desnaturante 1,2%, contendo formaldeído 1,85% (produto ativo), tampão MOPS 1X (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH7,0), sendo todas as condições livres de ribonuclease.

A cada amostra foi adicionado um tampão de corrida desnaturante e após eletroforese, o gel foi fotografado em câmera polaróide (modelo *Polaroid MP-4*), e incubado por dois períodos de 15 minutos em solução SSC 10X (cloreto de sódio 1,5 M, citrato de sódio 150 mM, pH 7,0). O gel foi então

colocado sobre o aparato de transferência e o RNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de *nylon*, em solução de SSC 10X por 15 a 18 horas (SAMBROOK et al., 1989; AUSUBEL et al., 1998). Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC 2X (cloreto de sódio 300 mM, citrato de sódio 30 mM, pH 7,0) por 1 minuto, seca em papel de filtro e o RNA foi imobilizado utilizando o *Stratalinker UV Crosslinker*, modelo 1800 (*Stratagene*). Esse aparelho tem como função fixar ácidos nucleicos a membranas de nitrocelulose ou *nylon*. Durante o *crosslinking* uma ligação covalente se forma entre o grupo amino do *nylon* e a timina do DNA ou uracila do RNA, a uma energia de 120000 microjoules/cm², utilizando uma lâmpada de luz UV de 254 nm (processo similar a dimerização de timina). O processo de *crosslinking* ocorre entre 25-50 segundos e tem sido demonstrado que o sinal de hibridização é significativamente aumentado quando comparado ao processo de aquecimento a 80°C por 2 h. As membranas foram armazenadas adequadamente até o momento de uso.

3.8.2. Marcação da Sonda

A marcação das sondas foi feita utilizando-se [α -P³²] dATP, 3000 Ci/nmol devido a dificuldade encontrada em se trabalhar com sondas marcadas a frio para análises de *Northern blot*. A reação de marcação foi feita pelo método do *random primers* segundo as recomendações do kit *Prime-It II - Random Primers Labeling* (*Stratagene*). Para cada reação foram utilizados entre 100 e 150 ng de sonda purificada. Após o término da reação as sondas marcadas foram armazenadas adequadamente a -20°C até o momento de uso.

3.8.3. Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de hibridização *Quik Hyb - Hybridization Solution* (*Stratagene*), à respectiva temperatura de hibridização para cada sonda, por 15-30 minutos. A sonda marcada com o [α -P³²] dATP, já adicionada de 1 mg de DNA de esperma de salmão, foi desnaturada em água fervente por 5 minutos, colocada no gelo, e misturada à mesma solução de hibridização, ficando a uma concentração de 10 a 15 ng de

sonda/mL. Nem todas as sondas obtidas apresentarem sinal após a hibridização em temperaturas que variaram de 55 a 63°C, devendo ser testados novos protocolos.

Para a sonda PvPR2, a reação de hibridização foi conduzida sob os seguintes parâmetros: 150 ng de sonda; 15 horas de hibridização à 63°C. As condições de lavagem após a hibridização foram de 25 minutos em solução de SSC 2X (cloreto de sódio 300mM, citrato de sódio 30 mM, pH 7,0), SDS 0,1% (dodecil-sulfato de sódio) por dois períodos, e depois 25 minutos em solução de SSC 1X (cloreto de sódio 150 mM, citrato de sódio 15 mM, pH 7,0), SDS 0,1%, todas as lavagens à 63°C. O filme radiográfico foi exposto por 36 h a -80°C e utilizando-se intensificador, e, em seguida, revelado.

As hibridizações com a sonda CHI e com a sonda para actina seguiram os seguintes parâmetros: 100 ng de sonda; 16 horas de hibridização à 55°C. As condições de lavagem após a hibridização foram de 15 minutos em solução de SSC 2X, SDS 0,1% por dois períodos à temperatura ambiente, e depois 30 minutos em solução de SSC 1X, SDS 0,1% à 55°C. O filme radiográfico foi exposto por seis dias a -80°C, utilizando-se intensificador, e, em seguida, revelado.

A hibridização com a sonda GLU apresentou os seguintes parâmetros: 150 ng de sonda; 15 horas de hibridização à 63°C. As condições de lavagem após a hibridização foram de 20 minutos em solução de SSC 2X/, SDS 0,1% por dois períodos, e depois 20 minutos em solução de SSC 1X, SDS 0,1%, sempre à 63°C. O filme radiográfico foi exposto por 48 h a -80°C sem intensificador, e, em seguida, revelado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de RNA Total e RT-PCR

No presente trabalho foi adaptado um protocolo de extração de RNA total que se baseia no método do isotiocianato de guanidina proposto originalmente por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987). As modificações feitas no processo de extração do RNA permitiram uma diminuição considerável no tempo necessário para a obtenção do RNA total extraído. Enquanto que com o protocolo original de CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987) a extração de RNA total é realizada em um dia e meio, com o protocolo adaptado neste trabalho o processo dura em torno de três horas.

Além da economia de tempo, o rendimento e a qualidade do RNA obtido com o método adaptado foram superiores quando comparados ao método original. Os RNAs extraídos de 40 amostras de folhas de feijoeiro mostraram-se íntegros, quando analisados por eletroforese em gel de agarose, como pode ser visto na Figura 3A. A relação A_{260}/A_{280} esteve entre 1,8 e 2,0, o que indica uma baixa contaminação por proteínas. No protocolo original, utilizado inicialmente em nosso laboratório, essa razão chegava a, no máximo, 1,7. O rendimento foi de aproximadamente 50 μg de RNA total por mg de folha, cerca de 2 vezes mais eficiente do que o protocolo original.

A técnica de RT-PCR, descrita nos itens 4.4 a 4.6, foi feita com o objetivo de verificar se os sete pares de *primers* desenhados eram eficientes em amplificar os cDNAs de interesse e, assim, gerar as sondas a serem

utilizadas nas análises de *Northern blot*. Após o isolamento de todos RNAs, foi feito o RT-PCR para os tratamentos de NIL inoculadas, resistente e suscetível, cujas folhas foram coletadas 48 h após a inoculação com *U. appendiculatus*. A escolha desses tempos se baseia em dados de literatura, que indicam que nesse período já se observa o aumento da transcrição da maioria dos genes relacionados ao processo de defesa da planta a patógenos, coincidindo com o período que se instala o processo de biotrofia do fungo (SCHMIDT e WOLF, 1999).

Os sete pares de *primers* geraram os fragmentos RT-PCR específicos, com os tamanhos esperados, demonstrando a eficiência dos *primers* construídos e das condições empregadas para amplificação dos cDNAs (Figura 1). Entre os indivíduos das NIL resistente e suscetível, ambos inoculados, não houve diferenciação do padrão de amplificação do cDNA (dados não mostrados). Isso significa que indivíduos resistentes e suscetíveis apresentaram bandas idênticas, quando suas respectivas populações de cDNA foram amplificadas com qualquer um dos sete pares de *primers* específicos.

A não diferenciação do padrão de expressão gênica entre indivíduos resistentes e suscetíveis, por RT-PCR, pode ser devido à alta sensibilidade da técnica, que permite a detecção de cDNAs correspondentes a mRNAs de baixo número de cópias. Assim, a técnica de RT-PCR, como feita, constituiu-se de uma análise qualitativa (ausência ou presença do fragmento RT-PCR específico), enquanto que a técnica de *Northern blot* permitiu uma análise semi-quantitativa da transcrição dos genes em estudo.

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos com as ampliações da população de cDNA originada da NIL resistente e inoculada, no tempo de 48 h. Os sete pares de *primers* geraram fragmentos com os tamanhos esperados, demonstrando a eficiência dos *primers* construídos e das condições empregadas para a amplificação dos cDNAs.

Como pode ser observado, os produtos RT-PCR mostram-se como bandas distintas, indicando que a transcrição reversa iniciada com oligo d-T₁₂₋₁₈ foi eficiente e que os *primers* construídos amplificam seqüências funcionais. Sabe-se que o *primer* oligo d-T, devido a sua alta especificidade, produz fragmentos de RT-PCR mais consistentes do que quando se utilizam

primers aleatórios ou específicos, que necessitam de otimização da razão *primer*/RNA (FROHMAN et al., 1988). Outra vantagem da iniciação com oligo d-T é que a partir de uma mesma população de cDNAs fita simples, fragmentos distintos podem ser amplificados, utilizando-se diferentes *primers* específicos, como foi o caso deste trabalho.

Nas preparações de RNA total não foi detectada a presença de DNA genômico contaminante, visto que os controles negativos (sem transcriptase reversa) não apresentaram bandas. Como controle adicional, para cada par de *primers* foi realizada uma amplificação utilizando como molde 20ng de DNA genômico do cultivar 'Ouro Negro' (ON). Além das amplificações com o DNA genômico do cultivar 'Ouro Negro', também foram utilizados como controles o DNA genômico do cultivar 'Rudá' e o DNA genômico pertencente às NIL resistente e suscetível (dados não mostrados). Entre estes materiais não houve diferenciação do padrão de amplificação do DNA genômico para nenhum dos *primers* utilizados. Para os *primers* CHI e PvPR3, não houve amplificação de DNA genômico, mesmo quando as condições de amplificação (concentração de magnésio, temperatura de anelamento e concentração dos *primers*) foram alteradas.

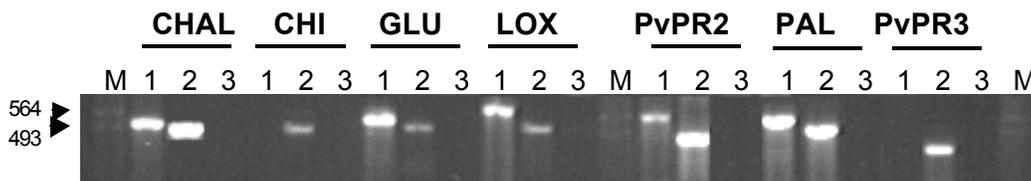


Figura 1 - Análise eletroforética, em gel de agarose 1,2%, dos resultados obtidos com as amplificações da população de cDNA originada da NIL resistente e inoculada, no tempo de 48 h. Os n^{os} de **1 a 3** correspondem aos materiais: **1** – DNA genômico (ON); **2** – população de cDNA iniciada com oligo d-T; **3** – controle negativo (RT -). As siglas **CHS, CHI, GLU, LOX, PvPR2, PAL, PvPR3** correspondem aos *primers* específicos utilizados na amplificação. **M** é o DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam* HI, *Eco* RI, e *Hind* III (tamanhos mostrados 564 e 493 pb).

Como os *primers* foram construídos a partir das seqüências de cDNA dos respectivos genes, é possível que nesses casos algum dos *primers* se encontrava justamente em uma junção de éxons, dificultando seu pareamento no DNA genômico, ou mesmo tornando a distância entre eles demasiadamente longa para ser amplificada.

4.2. Clonagem, Seqüenciamento e Comparação dos Fragmentos RT-PCR

Os fragmentos RT-PCR específicos para os cDNAs correspondentes às proteínas chalcona sintase, fenilalanina amônia-liase, glucanase, lipoxigenase, proteínas relacionadas à patogênese (PR) 2 e 3 e quitinase, constituíram as sondas utilizadas no *Northern blot*.

Os fragmentos de cDNA amplificados foram clonados no vetor pGEM-T e as construções denominadas pPvPR2, pCHI, pGLU, pCHS, pPAL e pLOX. As transformações feitas em *E. coli* para clonagem dos fragmentos amplificados foram bastante eficientes, obtendo-se para cada um dos sete fragmentos amplificados, um mínimo de 50 colônias transformantes por placa.

As seqüências nucleotídicas foram analisadas e editadas usando-se o programa *Seqman (DNASTAR Inc.)* (Figura 2). Todos os fragmentos apresentaram o tamanho esperado. No entanto, pode se observar que o seqüenciamento do fragmento de cDNA para CHS foi incompleto e apenas 358 pb dos 504 pb esperados foram seqüenciados.

As seqüências dos cDNAs foram comparadas às seqüências dos genes correspondentes depositadas no *GenBank*, por meio do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (Quadros 1, 2 e 3). A identidade de cada uma das potenciais sondas foi confirmada com o cDNA do qual foi originada (cDNA que deu origem aos respectivos *primers*), tendo com estes similaridades de seqüência acima de 95%. É importante observar que os números obtidos para o “valor E” foram muito pequenos para todas as comparações feitas, indicando que a probabilidade das similaridades observadas com as seqüências depositadas no banco de dados serem ao acaso é, praticamente, nula.

```
1  ATGGTGTGTTTAXAXATTXGAGTAXXAAAXXAXTIXXXXIXITIXXAIXTAXXXITAXAA 70
71  AIXIXITITAAITAXIXXGATAAXATXITXXXAAAITXXITITATIXXITXAAAGITITIT 140
141  AAATXITITAGITXAAIXITITXXXITAXXAIXAAAGATIXIXITIXXIXGATITIT 210
211  GAGAXAAAGTITITITITXAXAAAATAGAAITAAATAGATITAITXAAAXTITITATAXAIXTA 280
281  XAIXAIXITITITAGITITIXITXXITITXXAGAXAXITXAGAGAAATXAGXATXGAXIXXAAAX 350
351  TXAGITATITITXXXAAITTAITITXAGITITTAAGTITAGXATAAAAATAXAXIXAAAITAG 420
421  AITIXXAXXAAITTAAGATTAAGTIXAAAGTITITAAIXXAAAGATTAITITXITITIXAAG 465
ITXATITAAITTTAXXTTITTTGXXXAATXXT
```

A

A

1 **TXAGAXXTTAXAGATXTTXG** XTXXTIXAXGAXITTAITXIXXTIXIXGAPTTXXTIXTXX 70
71 XGAXITXTITTAITAGTAXITXITTTXITTTAXXITTTXIXAGIXAGAAAA 140
141 ITTAXXIXAXXGAXAGXTAATXXITTTXAAAXXGAXIXGXXIXXITXATXXGAGXAXXT 210
211 ITTAXXIXGIXIXITXTITXIXGATTTXAXXITXXITXTITXITXIXAGIXITXXTITAGAIT 280
281 AAGTIXGIXITTTTIXGAAIXGAXGAXITTTXITTTAGITTTXAGIXITXAAAAGAAITAGAITT 350
351 TTXITAAAITTAAGITTTXXIXITXAGIXITTTXITTTXIXGAXITTTTITATTTTXXITTTAXX 410
TTTAAITXITTTX**TTTTTXXTIXGXXTIXTGA**

B

1 **AXXAXATTGATGGTXXTGA** TTTTAXXGAAIXXXITTTTATTTAXAITXXIXAGITTTTAXA 70
71 TXXAITAXXAXAAITXTITTTAAAGAXAXXAXAXATXITTTXGAXAXITTTXITTTAGT 140
141 TXXXAAITXXITXGAAAITTTXIXGAXITTTXITTTTXXATAGITTTAAGITXXAAAGAXAAIT 210
211 TATXITTTAXXAGAXXITTTTAXXXITTTXIXGAAAGAXAATGATA XITTTXITXITXITTTX 280
281 TXGTXIXGATAATXXITTTXITTTAXXXATXTATXITTTXGATTTAGXAAAAAATTTXAGITTTX 350
351 AITTTTAAATTTTAAAAIXAGITTTXAAITXIXGIXITTTTITAGTAXTXXITXITGAXXAXAXTX 420
421 TXXGAAITXAAITTTAITAAITTTAGITXAXITTTAAGIXGIXIXITTTTAAAAITTTXITTT 490
491 XXAGXAXAXXAGAAITXAAITTTATXAAITTAITXXITTTAAAAAATX**TTXTT TGAAXAAT** 503
TXTIXAA

C

1 **XAAITGXXTXXATGATXAAA** TXGATTTTAXAXAGXXATTTAXATTTAXXXTTATAGTAAAXT 70
71 XXTAXXXTXXATXAXAAITTTXXTIXAITTTTATTTTATGATXATAXXTAGAXXXTATAATA 140
141 TTTTAXITTTTATATTTXAAITTTAXXITTTTATAGITTTAATTTTAXXXTTA TTTXAGTTAXITX 210
211 TTXAATXXITXITTTATATITXAXITTTXXTATTTXITTTTAXTITXAXXAAAAITTTTITTTAGT 280
281 GATTTXXAAATTTTAXXAAAAITTTTATTTXITTTTATTTATITXAGITTTXATTTXAGXXAAT 350
351 GATAAXAXTATTTATTTTAXITTTTATTTTITTTTITXITTTAGITTTTITTTXXIXAGATTTAG 420
421 TTTTITTTXXAXITTTTAXAXAXIXAGITTTTAXITTTTATAAXITTTTIXITXITTTTAAIT 490
491 AITAAITXXXTAGAATTTXXITXGAAITXXTAXAGAGAXTTATATA **TTTTXXATTTTXXGATTTAGA** 503
A

D

1 **GXXGATXAAAGAXATAGAGGX** ITTXGATTTAXXAAAIXTATTTAAAGAITTTXAGITTAAGITX 70
71 XATAAAITAGITTTTAXAGXXAAAITXAAAATTTAXAXAXITTTATATTTTAXXAXXAG A 140
141 ITXITTTAXAATTTXITTTXITTTTAXXAGITXAXXAAAIXTITTTAXITXITXXXITATTT 210
211 AAGAITTAXAATTTTAXXAAAAXAATTTTXXITTTXAGITTTXAXITTTXITTTXGAAITTTXAAAG 280
281 GATTTTXXITTTAGAAAXXAAAATTTTXXIXGIXITTTXITTTTITTTTITXITTTAGATTTXAXITTTA 350
351 XXXTXXITTTTXXAAITTTAXAXXXATXTAGAXAITTTTITTTAX 358

E

1 **GAAITGATGXAAGTGAAXX** ITAGTTTAXITGATXATTTTAXAXAXAAGITTTAAGTAXXAXXX 70
71 TTTTAAAAITGATTTXITTTXXATTTTATGAXAXATTTTATTTAAGITTTTAXAATTAAGITTA 140
141 TTXTAAGAAITTTXATTTAAATAGATXXITTTTAAAAAGTXXAAAAAXAAGATAGATATTTXXXITX 210
211 AGAAITXAXXAXAGITTTXITTTTXXITXATTTAAGTAXATTTTITXIXXAXXAAITXAAIT 280
281 TTAGAGAGATTTAAITXXITTTAATTTAXAAAXXXTITATTTATTTTAAITTTAAXAAGITXAT 350
351 TTXAITTTTAAITTTXAAITTAAXXXAAITTTAGTITXXAATTTAXAXAXAXITTTTITXT 420
421 XTITXATXITXITXAAAAXTAAITTTTITXAAITTTXIXGAGITTTTAAITTTTITXAXAA 490
491 XAAITTTXITTTXAAAATXITXAXITTTAGTAXGAAATX XTAGITTTTATTA**TTGTTTTXAAIT** 504
GAGXTGAA

F

1 **TTAAAXTTXXIXTITTTATTT** ATAAITAXITTTXITTTXAXGATXAAIXATTTXXTAAITATX 70
71 TTTTAXAAGAGITTTTAXITTTAAGTATXXATXITTTXIXXAXITTTTAAITTTTATTT 140
141 AITATTTAXXITTTXITTTATTTTATAGATATTTTATTTXAAITXAAITXXITTTTITTAG 210
211 TTTTAAAGAAITTTTAXITTTTIXAATTTTATTTTAAAGATAAGXXAATTTTXXAAAG 280
281 AITXAAAITXITTTAAATTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTT 350
351 TXXAITXAGITTTAAAXITTTTAXAATTTXAXATTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTT 420
421 TTAGXAGAAITTTXATTTXXITTTTAAATTTTXXITTTATTTTAAITTTTAAITTTTAAITTTTAAITTT 490
491 **A** 501

G

Figura 2: Sequências dos fragmentos de cDNA obtidos por RT-PCR. As regiões correspondentes aos *primers* utilizados estão destacadas em negrito. **A)** cDNA PvPR2 (465pb); **B)** cDNA PvPR3 (410 pb); **C)** cDNA CHI (503 pb); **D)** cDNA GLU (503 pb); **E)** cDNA CHS (358 pb); **F)** cDNA PAL (504 pb); **G)** cDNA LOX (501 pb).

Quadro 1 - Análise de similaridade entre as sequências primárias de proteínas de feijão relacionadas à patogênese, deduzidas de seus cDNAs correspondentes, e as sequências depositadas no *GenBank*.

Clones seqüenciados (em negrito) e seqüências homólogas	Acesso no GenBank	Espécie	Valor E
cDNA PvPR2			
Proteína 2 relacionada à patogênese (PvPR2)	P25986	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3e⁻⁷⁸
Proteína intracelular relacionada à patogênese	X96999	<i>Phaseolus vulgaris</i>	4e⁻⁷⁸
Proteína 3 relacionada à patogênese (CpPR3)	AB027154	<i>Vigna unguiculata</i>	5e⁻⁷⁵
Proteína 1 relacionada à patogênese (PvPR1) (PR2)	P25985	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3e⁻⁷²
Proteína induzida por estresse (SAM22)	P26987	<i>Glycine max</i>	2e⁻⁶⁷
Proteína de resposta de resistência a doença (DRRG49-c)	J03680	<i>Pisum sativum</i>	4e⁻⁵⁵
Proteína relacionada à patogênese PR-10	T06527	<i>Pisum sativum</i>	1e⁻⁵⁴
Proteína de resposta de resistência a doença – pl 49 (PR10)	P14710	<i>Pisum sativum</i>	1e⁻⁵⁴
cDNA PvPR3			
Proteína 3 relacionada à patogênese (PvPR3)	M75856	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1e⁻⁶⁴
Proteína desconhecida (posição 15087-14605)	AC069474	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2e⁻²⁶
Proteína relacionada à patogênese	AF140722	<i>Oryza sativa</i>	3e⁻²³
Proteína com domínios <i>zinc fingers</i>	T49033	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5e⁻¹⁸
Proteína com domínios <i>zinc fingers</i>	XP-005436	<i>Homo sapiens</i>	2e⁻¹⁷

No Quadro 1 está resumida a análise de similaridades para as proteínas de feijão relacionadas à patogênese. Para o cDNA correspondente a PvPR2 os mais altos níveis de similaridade foram alcançados entre proteínas relacionadas à patogênese de feijão, caupi, soja, ervilha e outras. As PR de feijão apresentaram similaridades entre 95 e 86% com PvPR2. AWADE et al. (1991) verificaram que as seqüências de aminoácidos de PR2 do feijoeiro (proteína identificada previamente por De TAPIA et al. (1986)) e de PvPR1 são

idênticas, sendo as duas a mesma proteína. Dentre as PR ácidas de feijão, PR2 é a única com localização intracelular, o que conduz ao pressuposto de que PvPR1 e PvPR2 sejam proteínas citosólicas.

VAN LOON et al. (1994) renomearam as proteínas PvPR1 e PvPR2 para PR-10a e PR10b, respectivamente, seguindo a nomenclatura da classe de proteínas intracelulares. As proteínas PR-10 podem ser ribonucleases, já que apresentam significativa similaridade de seqüência com duas ribonucleases de ginseng e com as proteínas PR-10 de salsa (MOISEYEV et al., 1994). Similaridades com várias proteínas PR-10 foram observadas na busca feita no GenBank, como pode ser exemplificado no Quadro 1.

WALTER et al. (1990) já havia comparado a estrutura primária das proteínas PvPR1 e PvPR2 com seqüências depositadas em banco de dados de proteínas, revelando que existe similaridade entre PvPR1 e a proteína pl49 de ervilha (64% de identidade), cuja estrutura foi deduzida de um gene de resposta a doenças (FRISTENSKY et al., 1988), e similaridade com a proteína PcPR1-1 de salsa (39% de identidade), a qual é detectada em folhas de salsa após 4 h de inoculação com patógeno fúngico (SOMSSICH et al., 1988). As proteínas não se relacionaram estruturalmente com a classe PR1 de tabaco, mas demonstraram homologia a uma proteína de pólen de videiro (*birch pollen protein*), que é um alérgeno causador de rinoconjutivite e asma brônquica no homem (BREITENEDER et al., 1989).

A proteína PvPR3 apresentou-se como uma proteína bastante distinta, com baixos níveis de similaridade de seqüência com outras. Isso pode ser demonstrado observando-se que a similaridade cai de 92 para 42% quando trata-se de sua seqüência idêntica, PvPR3 de feijão (*GenBank* M75856, 1e⁻⁶⁴), e uma seqüência desconhecida de *Arabidopsis thaliana* (*GenBank* AC069474, 2e⁻²⁶). Além disso, verificou-se que PvPR3 apresentou diferentes graus de similaridade com proteínas hipotéticas ou desconhecidas de várias espécies e com proteínas que apresentam *zinc fingers*, inclusive humanas. SHARMA et al. (1992) que isolaram o cDNA de PvPR3 haviam verificado que as estruturas e os modos de regulação de PvPR3 são muito distintos daqueles previamente descritos para proteínas PR, incluindo PvPR1 e PvPR2.

A comparação dos cDNAs correspondentes aos fragmentos amplificados com os *primers* específicos para as proteínas hidrolíticas, quitinase e glucanase, é apresentada no Quadro 2.

Quadro 2 - Análise de similaridade entre as seqüências primárias de proteínas hidrolíticas de feijão, quitinase e glucanase, deduzidas de seus cDNAs correspondentes, e as seqüências depositadas no *GenBank*.

Clones seqüenciados (em negrito) e seqüências homólogas	Acesso no <i>GenBank</i>	Espécie	Valor <i>E</i>
cDNA Quitinase			
Precursor pr4 de quitinase (Chi 4)	P27054	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2e⁻⁷⁶
Quitinase de classe 4 (fragmento)	S57476	<i>Vigna unguiculata</i>	2e⁻⁷⁴
Quitinase de classe 4 (CHI IV)	T47601	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e⁻⁶²
Endoquitinase de classe 4	U97521	<i>Vitis vinifera</i>	6e⁻⁵³
Quitinase de classe 4 (PR-3)	AB054687	<i>Oryza sativa</i>	4e⁻⁴⁸
Precursor ácido SP2 de endoquitinase	P42820	<i>Beta vulgaris</i>	5e⁻⁴³
cDNA Glucanase			
Beta-1,3-endoglucanase, isoforma básica	P23535	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7e⁻⁸⁴
Precursor de beta-1,3-endoglucanase (fragmento)	S13323	<i>Phaseolus vulgaris</i>	4e⁻⁸³
Beta-1,3-endoglucanase	AJ131047	<i>Cicer arietinum</i>	2e⁻⁷⁰
Beta-1,3-endoglucanase	S51479	<i>Pisum sativum</i>	7e⁻⁶⁸
Glucanase ácida	U27179	<i>Medicago sativa subsp. sativa]</i>	7e⁻⁶⁶
Precursor de beta-1,3- endoglucanase (forma básica vacuolar)	P52407	<i>Hevea brasiliensis</i>	2e⁻⁵⁷
Precursor de beta-1,3-endoglucanase	Q01413	<i>Lycopersicon esculentum</i>	6e⁻⁵⁷

O fragmento de cDNA para quitinase isolado pertence às quitinases de classe IV (*GenBank* P27054, 2e⁻⁷⁶), demonstrando graus de similaridade diferentes para membros dessa classe em outras espécies. As enzimas dessa classe têm como características a localização no compartimento apoplástico,

serem ácidas e, ao contrário das quitinases de classe II e III, possuem um domínio rico em cisteína, com função ainda desconhecida. MARGIS-PINHEIRO et al. (1991) compararam a seqüência da quitinase PR4 (255 resíduos de aminoácidos), proteína correspondente ao cDNA CHI isolado (*GenBank* P27054, $2e^{-76}$), com sua isoforma básica localizada no vacúolo (301 resíduos de aminoácidos). Esses autores mostraram que a homologia baseada no número de resíduos de aminoácidos idênticos, em posições similares nas duas isoformas, é somente de 41%. Em tabaco, a similaridade entre a PR-P ácida e as quitinases básicas é de 59% (LINTHORST et al., 1990). Além disso, PR4 também difere de outras quitinases ácidas conhecidas, como a PR3, também do feijoeiro (De TAPIA et al., 1986), por possuir um domínio amino-terminal rico em cisteína. A molécula precursora de PR4 apresenta um peptídeo sinal de 15 aminoácidos, característico de quitinases da classe IV (MARGIS-PINHEIRO et al., 1991).

A comparação das seqüências do clone para glucanase com outras seqüências presentes no *GenBank*, assim como as anteriores, revelou que estas proteínas apresentam alta similaridade com outras proteínas de mesma função. EDINGTON et al. (1991) verificaram que o cDNA isolado para a endoglucanase de feijão (*GenBank* P23535, $7e^{-84}$) foi 59% similar ao seu correspondente em tabaco e 46% ao de cevada. Analisando a estrutura primária da enzima, os autores concluíram que essa é uma endo-1,3-beta-D-glucanase básica, de localização vacuolar.

Os cDNAs correspondentes a enzimas de vias biossintéticas que estão relacionadas com a resposta de defesa em plantas, como chalcona sintase, fenilalanina amônia-liase e lipoxigenase, são apresentados no Quadro 3. A estrutura primária dessas três enzimas é bastante conservada, em geral, já que participam de vários processos vitais na célula, podendo também atuar indiretamente na defesa contra patógenos. Além disso, freqüentemente os genes que codificam tais enzimas pertencem a famílias multigênicas e estão arranjados em blocos gênicos (MEIER et al., 1993).

A comparação da seqüência de aminoácidos de chalcona sintase de feijão, deduzida da seqüência do cDNA correspondente, com as depositadas no *GenBank*, revelou uma série de similaridades com enzimas chalcona

sintase de outras espécies de plantas. Nos exemplos mostrados no Quadro 3, a similaridade foi superior a 90%. Apesar de não ter sido possível seqüenciar esse clone por completo, a seqüência parcial obtida permitiu a sua identificação. RYDER et al. (1987) verificaram que existem pelo menos seis diferentes genes para CHS no genoma do feijoeiro e alguns estão fortemente ligados entre si. Esses autores isolaram o cDNA que foi utilizado como molde

Quadro 3 - Análise de similaridade entre as seqüências primárias de enzimas de vias biossintéticas relacionadas ao processo de defesa do feijão, deduzidas de seus cDNAs correspondentes, e as seqüências depositadas no *GenBank*.

Clones seqüenciados (em negrito) e seqüências homólogas	Acesso no <i>GenBank</i>	Espécie	Valor <i>E</i>
<i>cDNA Chalcona Sintase</i>			
Chalcona sintase 17	P49440	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2e⁻⁶⁰
Chalcona sintase	X74821	<i>Vigna unguiculata</i>	1e⁻⁵⁹
Chalcona sintase 4	L24516	<i>Trifolium subterraneum</i>	4e⁻⁵⁹
Chalcona sintase	D88263	<i>Pisum sativum</i>	4e⁻⁵⁹
Chalcona sintase 5	D88262	<i>Pisum sativum</i>	4e⁻⁵⁹
Chalcona sintase 2	M91194	<i>Trifolium subterraneum</i>	4e⁻⁵⁹
<i>cDNA Fenilalanina Amônia-Liase</i>			
Fenilalanina amônia-liase de classe I (PAL1)	P07218	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2e⁻⁹³
Fenilalanina amônia-liase de classe I (fragmento)	A24727	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2e⁻⁹³
Fenilalanina amônia-liase de classe I (PAL1)	P27991	<i>Glycine max</i>	1e⁻⁹²
Fenilalanina amônia-liase	P27990	<i>Medicago sativa</i>	2e⁻⁹¹
Fenilalanina amônia-liase	P45734	<i>Trifolium subterraneum</i>	2e⁻⁹⁰
Fenilalanina amônia-liase 1	Q01861	<i>Pisum sativum</i>	3e⁻⁹⁰
Fenilalanina amônia-liase de classe II (PAL2)	P19142	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2e⁻⁹⁰

<i>cDNA Lipoxigenase</i>			
Lipoxigenase loxB	P27481	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7e⁻⁹⁵
Lipoxigenase	AF20421 0	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1e⁻⁹³
Lipoxigenase	AF23498 3	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1e⁻⁸⁵
Lipoxigenase 7	T06596	<i>Glycine max</i>	2e⁻⁸⁴
Lipoxigenase L-5	T07036	<i>Glycine max</i>	3e⁻⁸⁴
Lipoxigenase L-4	P38417	<i>Glycine max</i>	2e⁻⁸³
Lipoxigenase -3 (Lox 3)	P09918	<i>Pisum sativum</i>	3e⁻⁷⁰
Lipoxigenase	T11852	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3e⁻⁶⁵

para construção dos *primers* CHS neste trabalho (*GenBank*, P49440, 2e⁻⁶⁰).

A comparação da estrutura primária da proteína fenilalanina amônia-liase, deduzida do cDNA correspondente e isolado, revelou que esta proteína apresenta sua estrutura primária altamente conservada, sendo encontradas similaridades com várias espécies, em especial com leguminosas, como o próprio feijão, soja e ervilha.

EDWARDS et al. (1985) isolaram e caracterizaram um cDNA de feijão que codifica PAL, cujo clone completo foi denominado pPAL5, que continha uma única ORF de 1520 pb de região traduzível e 223 pb de região 3', não traduzível. Esse cDNA corresponde à seqüência *GenBank*, P07218, 2e⁻⁹³, que originou os pares de *primers* para PAL.

O cDNA para lipoxigenase apresentou similaridades superiores a 90% com outras lipoxigenases de feijão. Também apresenta alta homologia com várias lipoxigenases de soja, como pode ser visto no Quadro 3. MEIER et al. (1993) caracterizaram um clone de cDNA parcial de lipoxigenase de feijoeiro, com 2,2 Kb, que denominaram LOX3 e que corresponde ao cDNA isolado neste trabalho. Analisando sua seqüência identificaram o sítio de ligação a ferro, típico de LOX (BAIROCH, 1990).

Todos clones analisados e que apresentaram similaridade com as seqüências de cDNA correspondentes às proteínas em estudo foram utilizados

como sondas homólogas em experimentos de *Northern blot*, para análise da cinética de expressão de seus genes correspondentes quando o feijoeiro é infectado com *U. appendiculatus*.

4.3. Análise da Expressão Temporal

4.3.1. Proteína Relacionada à Patogênese PvPR2

A Figura 3A mostra a hibridização com a sonda de cDNA PvPR2, podendo-se observar que nos indivíduos resistentes (n^{os} de 1 a 10) a indução do gene para PvPR2 ocorreu mais rapidamente do que nos indivíduos suscetíveis (n^{os} de 11 a 20), sendo a diferença detectada de um intervalo de 6 h. Em muitos casos a diferença principal entre interações resistentes e suscetível é a rapidez, e não a extensão, da expressão de genes envolvidos com a resposta de defesa, o que sugere que altos níveis de proteínas PR no sítio de infecção possa ser um mecanismo de defesa efetivo contra patógenos virulentos (LAMB, 1994). A Figura 3B mostra o padrão do RNA total fracionado por eletroforese em gel de agarose desnaturante, onde observamos a boa qualidade do RNA isolado, representada pela integridade das bandas correspondentes aos rRNAs.

No material resistente há um pico de expressão no tempo de 12 h após a inoculação, decaindo gradativamente o sinal até o tempo de 96h. No material suscetível o pico de expressão foi observado no tempo de 24 h, decaindo após esse tempo e mantendo-se constante até 96h. A hibridização da sonda PvPR2 com o material controle (não inoculado) não gerou nenhum sinal, indicando que não houve indução da expressão do gene PvPR2 nessa situação (dados não mostrados). Esse resultado e o apresentado na Figura 3A nos permitem inferir que há uma expressão diferencial entre o material resistente e o suscetível em resposta à inoculação com o fungo *U. appendiculatus*.

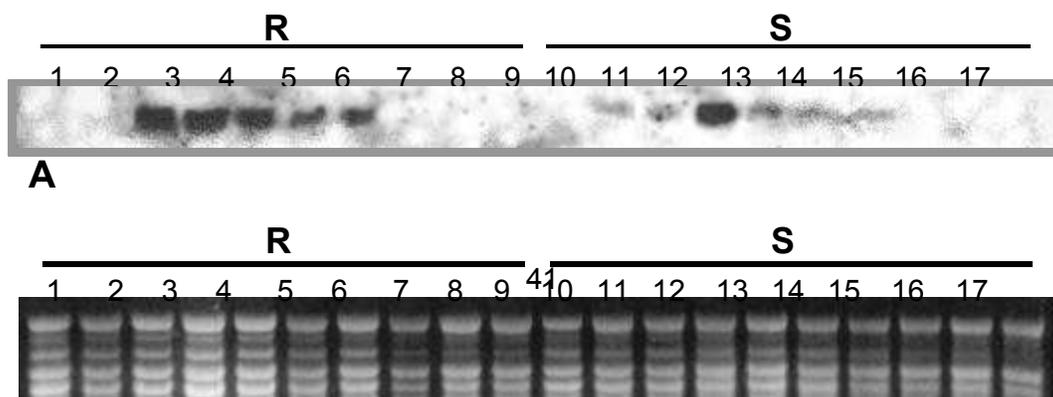


Figura 3 - **A)** Autorradiografia da análise de *Northern blot* para a sonda PvPR2. A membrana foi hibridizada com a sonda PvPR2, marcada com $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{dATP}$, em condições de alto rigor. O tamanho aproximado da banda acima é 850pb. Em ambas figuras os n^{os} de **1 a 10** correspondem ao RNA total de plantas resistentes (**R**), e os n^{os} de **11 a 20** ao de plantas suscetíveis (**S**). Os tempos de coleta de folhas após a inoculação são indicados pelos n^{os}: **1 e 11** – zero h; **2 e 12** - 6 h; **3 e 13** – 12 h; **4 e 14** – 24 h; **5 e 15** – 36 h; **6 e 16** – 48 h; **7 e 17** – 96 h; **8 e 18** – 144 h; **9 e 19** – 195 h; e **10 e 20** -240h. **B)** Análise eletroforética em gel desnaturante de agarose 1,2% do RNA total extraído de plantas inoculadas com *U. appendiculatus*.

Segundo o trabalho de WALTER et al. (1990), que isolaram os cDNAs correspondentes aos genes para as proteínas intracelulares PvPR1 e PvPR2 de feijão (agora chamadas de PR-10a e PR-10b), o tamanho esperado para o mRNA correspondente a esses genes é de aproximadamente 850 pb. Esses autores, utilizando cultura de células de feijão tratadas com elicitor do fungo causador da antracnose, analisaram a cinética de expressão desses genes durante 24 h após a adição do elicitor. Eles verificaram que existe um intervalo de tempo (cerca de uma hora) entre a indução de PvPR1 e PvPR2, sendo PvPR2 induzido mais tardiamente. No entanto, em estudos entre cultivares resistentes e suscetíveis à antracnose, verificou-se que os indivíduos resistentes atingiam o pico de expressão para estes genes mais rapidamente do que os suscetíveis, como ocorreu no presente trabalho. Acredita-se que esse ganho de tempo seja decisivo no processo de restrição de crescimento do patógeno.

A comparação da estrutura primária de PvPRs com outras proteínas relacionadas à patogênese com características semelhantes, demonstrou que, embora não haja informação conclusiva sobre a função dessas proteínas, percebe-se que há conservação de resíduos de glicina e de aminoácidos eletricamente carregados que parecem ser importantes na sua estrutura terciária e, provavelmente, na sua função (WALTER et al., 1990; SOMSSICH et al., 1988).

As semelhanças estruturais entre as proteínas PvPRs, ribonucleases de ginseng e proteínas PR-10 de salsa (MOISEYEV et al., 1994) indicam um possível papel fisiológico para essas proteínas. Ribonucleases citosólicas podem ter envolvimento com degradação seletiva e altamente regulada de mRNAs existentes na célula vegetal durante estresse ou ataque de patógenos (WALTER et al., 1996). Em animais, a resposta a patógenos está,

freqüentemente, associada a atividades nucleolíticas, que conduzem à morte celular programada (COLLINS e RIVAS, 1993) e em folhas de trigo infectadas pelo fungo causador da ferrugem do trigo, também verifica-se aumento dos níveis de atividade ribonucleásica (BARNA et al., 1989).

4.3.2. Proteína Quitinase

Outras proteínas relacionadas à patogênese e cujas funções são bem conhecidas são as enzimas hidrolíticas quitinase e glucanase. Essas podem ter localização intra ou extracelular. A sonda CHI, isolada neste trabalho, origina-se de um cDNA para uma quitinase de classe IV de feijão, denominada PR4, de localização extracelular e de caráter ácido. MARGIS-PINHEIRO et al. (1991) verificaram que o mRNA correspondente ao gene desta proteína apresentava 1,1 Kb.

Na Figura 4A observa-se uma nítida diferença entre a cinética de expressão dos indivíduos resistentes e suscetíveis, ambos apresentando uma escala gradativa do sinal de expressão, nas primeiras horas após a infecção. Esse sinal intensifica-se até o período de 96 h após a inoculação, correspondendo ao pico de expressão, tanto no material resistente quanto no suscetível. Após esse período os níveis do mRNA começam a decair. No entanto, verifica-se que nos indivíduos resistentes (n^{os} de 1 a 10) o sinal de expressão já se intensifica no tempo de 24 h, enquanto que nos suscetíveis (n^{os} de 11 a 20) um sinal mais consistente só é alcançado no tempo de 48 h.

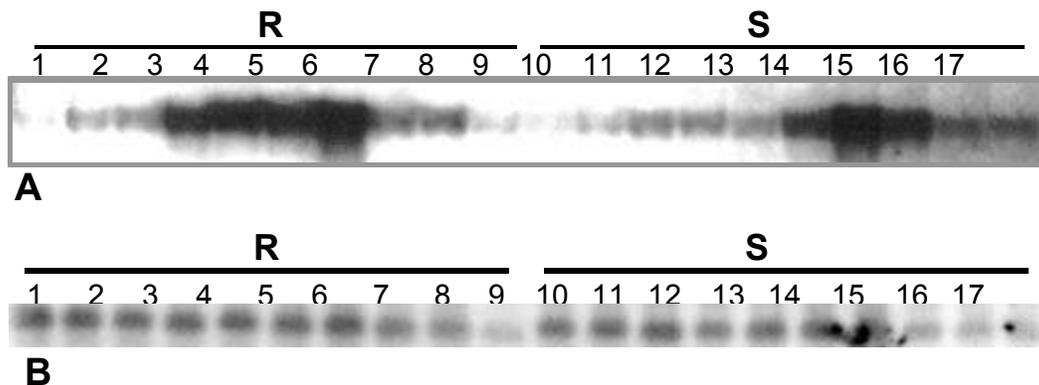


Figura 4 - **A)** Autoradiografia da análise de *Northern blot* para a sonda CHI. A membrana foi hibridizada com a sonda CHI, marcada com [α -P³²] dATP, em condições de rigor moderado. A banda acima apresenta um tamanho esperado de 1,1 kb. Em ambas figuras os n^{os} de **1 a 10** correspondem ao

RNA total de plantas resistentes (**R**), e os n^{os} de **11 a 20** ao de plantas suscetíveis (**S**). Os tempos de coleta de folhas após a inoculação são indicados pelos n^{os}: **1 e 11** – zero h; **2 e 12** - 6 h; **3 e 13** – 12 h; **4 e 14** – 24 h; **5 e 15** – 36 h; **6 e 16** – 48 h; **7 e 17** – 96 h; **8 e 18** – 144 h; **9 e 19** – 195 h; e **10 e 20** - 240h. **B**) Autoradiografia da análise de *Northern blot* para a sonda para actina de milho.

Um dos fatos que suportam a participação de quitinases no processo de defesa de plantas é a inexistência de um substrato conhecido para essas enzimas em células vegetais, e por ser a quitina um componente comum da parede celular de vários fungos. Acredita-se que quitinases intracelulares devam ser efetivas contra fungos necrotróficos, que causam danos extensivos ao tecido vegetal, e não a fungos biotróficos, que em geral sofrem degradação da parede celular por quitinases extracelulares (MAUCH e STHEHELIN, 1989).

Sendo o fungo causador da ferrugem do tipo biotrófico, a indução de quitinases extracelulares é prevista. Além disso, verificou-se novamente que a expressão de um gene relacionado à defesa foi mais rápido na planta resistente do que na suscetível, indicando a importância da rapidez de uma resposta de defesa para impedir a infecção pelo patógeno. Além de causarem inibição de crescimento de fungos, o que já foi comprovado *in vitro* (MAUCH et al., 1988b), quitinases também favorecem a liberação de fragmentos de parede celular que podem ser elicitores ativos para desencadear o processo de resistência em interações incompatíveis (KEEN et al., 1983).

Um atraso na indução de mRNAs para genes relacionados à defesa tem sido observado em interações compatíveis de feijoeiro, quando comparadas a interações incompatíveis. Isso foi mostrado para mRNAs correspondentes aos genes de fenilalanina amônia-liase, chalcona sintase (BELL et al., 1986), chalcona isomerase (MEHDY e LAMB, 1987), quitinase (HEDRICK et al., 1988) e glicoproteína rica em hidroxiprolina (CORBIN et. al, 1987) após infecção do feijoeiro com uma raça virulenta e outra avirulenta do fungo causador da antracnose. Dessa forma, o resultado obtido e apresentado na Figura 4A está de acordo com o que se espera para uma interação do tipo incompatível (material resistente) e compatível (material suscetível).

MAHÉ et al. (1992) estudou interações compatíveis e incompatíveis de várias raças do fungo *C. lindemuthianum* com o feijoeiro. Analisando por *Northern blot* o padrão de expressão obtido com uma sonda também correspondente ao cDNA para o gene PR4 ele observou que nas interações

compatíveis os níveis máximos de expressão eram alcançados 116 h após a inoculação e que nas interações incompatíveis esse máximo foi alcançado no tempo de 84h.

A hibridização com a sonda de actina (Figura 4B), feita sob os mesmos parâmetros da sonda para CHI, mostrou que a quantidade de mRNA entre as amostras parece uniforme, com exceção da n^o 10 (resistente – tempo de 240 h) que possui menos mRNA. Além disso, o sinal verificado no tempo zero, quando feita a hibridização com a sonda CHI, mesmo que muito fraco demonstra que um estímulo diferente da inoculação já havia induzido a expressão dessa enzima. Mesmo que os experimentos de casa de vegetação tenham sido conduzidos em condições de baixa concentração de inóculo, e porque essas quitinases podem ser induzidas tanto por estresses bióticos quanto abióticos, esse resultado pode ser esperado, sem que interfira com a indução alcançada pela infecção com *U. appendiculatus*.

A temperatura de 55°C é uma temperatura relativamente baixa para a hibridização de uma sonda homóloga como CHI, no entanto, tentativas anteriores haviam sido feitas utilizando-se lavagens menos rigorosas e hibridização a temperaturas superiores a 60°C, sem obter sucesso. Apesar do sinal ser constituído de banda única, existe a possibilidade de hibridização cruzada com mRNAs de proteínas da mesma família, mesmo que no caso, a sonda não possa ser considerada pequena. No entanto, como o controle negativo (material não inoculado) foi hibridizado com a sonda CHI nas mesmas condições e não houve nenhum sinal (dado não mostrado), é provável que a hibridização do material inoculado com a sonda de cDNA para o gene PR4 tenha ocorrido de maneira específica, sendo um dado consistente.

4.3.3. Proteína Glucanase

Além de quitinases, as respostas de defesa contra patógenos fúngicos, em geral, também envolvem indução de glucanases, que degradam compostos glucanos da parede celular desses organismos, podendo haver liberação de elicitores. A sonda para glucanase utilizada neste trabalho, corresponde a uma endoglucanase de feijão, de localização intracelular.

O resultado para a sonda GLU, em termos de qualidade do *Northern blot*, foi muito bom, não apresentando nenhum *background*, como ocorreu com a sonda PvPR2 (Figura 3A), que foi hibridizada à mesma membrana, após a retirada da sonda GLU. O resultado do *Northern blot* é apresentado na Figura 5A, na qual pode-se observar que o padrão de expressão para a endoglucanase foi similar entre indivíduos resistentes (n^{os} de 1 a 10) e suscetíveis (n^{os} de 11 a 20), porém nota-se que nos suscetíveis a queda na expressão gênica é mais lenta.

O pico de expressão ocorreu no tempo de 36 h após a inoculação, decaindo gradativamente o sinal até o tempo de 96 h, em ambos materiais, sendo que no material suscetível a expressão perdurou até o tempo de 144 h. No tempo zero hora após a inoculação não foi possível distinguir nenhum sinal, o que indica a indução da expressão *de novo* da endoglucanase de feijão. A Figura 5B mostra a análise eletroforética dos RNAs totais transferidos para a membrana que foi hibridizada com as sondas GLU e com PvPR2.

Quando foi feita a busca no *GenBank* para seqüências de cDNA de genes para glucanases de feijoeiro, não foram encontradas seqüências para

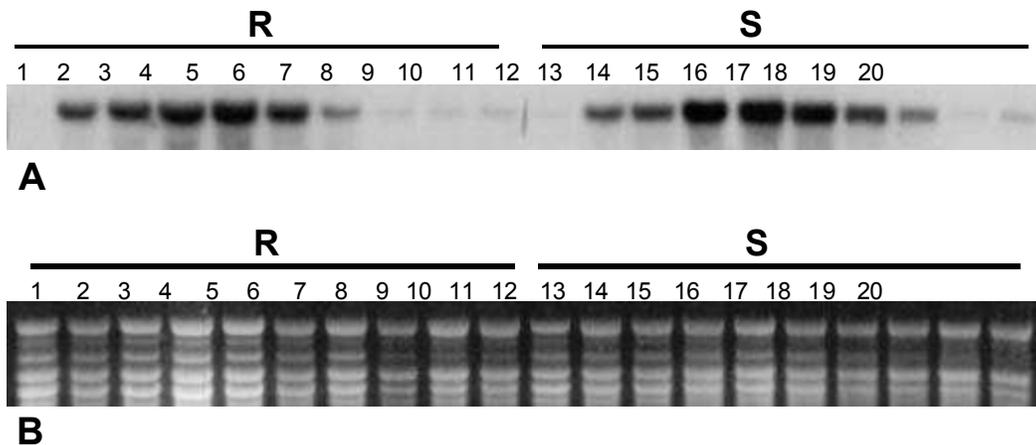


Figura 5 - **A)** Autoradiografia da análise de *Northern blot* para a sonda GLU. A membrana foi hibridizada com a sonda GLU, marcada com [α -P³²] dATP, em condições de alto rigor. Em ambas figuras os n^{os} de **1 a 10** correspondem ao RNA total de plantas resistentes (**R**), e os n^{os} de **11 a 20** ao de plantas suscetíveis (**S**). Os tempos de coleta de folhas após a inoculação são indicados pelos n^{os}: **1 e 11** – zero h; **2 e 12** – 6 h; **3 e 13** – 12 h; **4 e 14** – 24 h; **5 e 15** – 36 h; **6 e 16** – 48 h; **7 e 17** – 96 h; **8 e 18** – 144 h; **9 e 19** – 195 h; e **10 e 20** – 240h. **B)** Análise eletroforética em gel desnaturante (agarose a 1,2%) do RNA total extraído de plantas inoculadas com *U. appendiculatus* glucanases ácidas, de localização extracelular, que é o tipo de glucanase que

se espera ser induzida por um fungo biotrófico como *U. appendiculatus*.

Assim, os *primers* foram desenhados a partir da seqüência de um cDNA de glucanase básica, isolado por EDINGTON et al. (1991), a partir de células de feijoeiro tratadas com elicitor fúngico.

É provável que a maioria das proteínas relacionadas à patogênese exibam atividade antimicrobiana. Esse fato não é simples de ser demonstrado, visto que sua atividade pode ser específica para um dado tipo de patógeno (por exemplo, a proteína PR1 de tabaco parece ser mais efetiva contra fungos oomicetos) Também é provável que proteínas relacionadas à patogênese não sejam sempre efetivas contra o patógeno que as induz, podendo apenas fazer parte de um mecanismo de resistência geral contra uma infecção secundária (DIXON et al., 1996).

De TAPIA et al. (1986 e 1987) já havia verificado que o acúmulo do mRNA para a quitinase PR4 ocorreu 2 h após o tratamento químico (solução de cloreto de mercúrio 0,2%) e dentro de dois dias após infecção viral. Sabe-se que estas enzimas podem ter seus níveis de expressão aumentados em algumas infecções virais, mas provavelmente não têm efeito contra o vírus, fazendo parte apenas da rede de mecanismos de resistência da planta. Não há ainda uma evidência direta de que proteínas PR induzidas em tabaco em resposta ao vírus TMV tenham qualquer efeito direto no vírus, entretanto elas podem ser um componente chave na resistência sistêmica adquirida a patógenos fúngicos e bacterianos (DIXON et al., 1996).

MAUCH e STAHELIN (1989) analisaram folhas de feijão tratadas com etileno e verificaram que a 1,3-beta-D-glucanase básica localiza-se predominantemente nos vacúolos. No entanto uma proporção significativa da enzima induzida é encontrada na parede celular, o que não foi documentado para quitinases básicas não induzidas, que ficam limitadas ao vacúolo. Enzimas vacuolares podem agir como proteínas de defesa tardia, enquanto a glucanase localizada na parede celular poderia também estar envolvida em reconhecimento e liberação de elicitores. Como glucanases liberam moléculas de glucano da parede de fungos patogênicos, essas moléculas podem agir como elicitores, desencadeando o processo de resistência. Dessa forma, poder-se-ia esperar a indução de glucanases e outras proteínas relacionadas a

defesa, como as envolvidas na síntese de fitoalexinas e reforço da parede celular da célula vegetal.

VAN DEN BULCKE et al. (1989) estudaram as atividades da glucanase vacuolar (isoforma básica) e da glucanase localizada na parede celular (isoforma ácida) de tabaco e verificaram que estas são claramente distintas uma da outra, em relação a sua regulação durante a defesa induzida.

Os experimentos de *Northern blot* com as sondas PvPR3, CHS, PAL e LOX não apresentaram resultados satisfatórios após a hibridização, mesmo quando os parâmetros do processo (quantidade de sonda, tempo de hibridização, período e rigor das lavagens pós-hibridização, tempo de exposição ao filme) foram modificados, não sendo possível discutir o padrão de expressão para as mesmas. Em novos experimentos o emprego de protocolos de hibridização que utilizam formamida poderá ser uma possível solução para a hibridização dessas sondas, assim como diminuir o rigor para a temperatura de hibridização.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

As NIL resistente e suscetível à ferrugem mostraram-se materiais adequados para extração de RNA total de folhas infectadas pelo fungo *U. appendiculatus*, visando o estudo da expressão temporal de genes relacionados ao processo de defesa do feijoeiro infectado pelo fungo.

Os fragmentos RT-PCR amplificados com os *primers* específicos para genes que codificam as proteínas chalcona sintase, fenilalanina amônia-liase, glucanase, lipoxigenase, proteínas relacionadas à patogênese (PR) 2 e 3 e quitinase foram clonados, seqüenciados e corretamente identificados em bancos de dados de seqüências.

A análise da expressão diferencial de genes que codificam proteínas envolvidas com defesa da planta a patógenos foi feita para as sondas correspondentes aos genes que codificam as proteínas PvPR2, quitinase e glucanase. A cinética da expressão gênica desses genes foi analisada por *Northern Blot* nos vários tempos após a inoculação, no material resistente e suscetível.

A hibridização com as sondas PvPR2 e CHI apresentou expressão diferencial entre os indivíduos resistentes e suscetíveis, sendo indivíduos resistentes mais rápidos na indução do gene para PvPR2 do que os indivíduos suscetíveis. Porém o atraso na expressão gênica no material suscetível foi de 6 h para PvPR2 e 24 h para CHI. Para a sonda PvPR2 a expressão apresentou maior extensão nos indivíduos resistentes, enquanto que para sonda CHI os

indivíduos resistentes e suscetíveis apresentaram período de extensão da expressão gênica similares. Em muitos casos a diferença principal entre interações resistente e suscetível é a rapidez, e não a extensão, da expressão de genes envolvidos com a resposta de defesa.

A sonda para o gene de glucanase mostrou-se homóloga a uma endoglucanase, que é uma proteína intracelular. O resultado da hibridização mostrou que não houve expressão diferencial entre os indivíduos resistentes e suscetíveis, indicando que o gene que codifica essa proteína pode ser induzido por *U. appendiculatus*, mas a enzima não atua no processo de restrição de crescimento do fungo.

A importância dos clones de cDNA isolados e caracterizados, é principalmente, sua utilização em trabalhos futuros, como sondas em análises de hibridização de ácidos nucléicos, para estudar além da expressão temporal, expressão tecido-específica dos genes aos quais eles correspondem. Os clones que se mostraram relacionados com o processo de defesa às doenças do feijoeiro poderão ser utilizados como sondas para isolar os genes correspondentes em bibliotecas genômicas e de cDNA, permitindo a caracterização molecular desses genes. Sob o controle de promotores de plantas induzidos por patógenos esses genes de proteínas relacionadas ao processo de defesa poderão ser utilizados em experimentos de transformação de plantas, para conferir tolerância e/ou resistência às mesmas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGRIANUAL - **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Argos Comunicações. FNP Consultoria e Comércio, p. 435, 1997.
- AGRIANUAL - **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Argos Comunicações. FNP Consultoria e Comércio, p.521, 1999.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**, Academic Press, San Diego, CA, 1988.
- ALLEN, E. A., HOCH, H. C., STAVELY, J. R., STEADMAN, J. R. Uniformity among races of *Uromyces appendiculatus* in response to topographic signaling for appressorium formation. **Phytopathology**, v. 81: p. 883-887, 1991.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z, MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v. 25: p. 3389-3402, 1997.
- ALWINE, J. C., KEMP, D. J., STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxmethyl paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Science -USA**, v. 74: p. 5350-5354, 1977.
- ALWINE, J. C., KEMP, D. J., PARDER, B. A., REISER, J., RENART, J., STARK, G. R., WAHL, G. M. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxmethyl paper. **Methods in Enzymology**, v. 68: p. 220- 239, 1979.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, K. S. **Currents Protocols in Molecular Biology in CD-ROM**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- AWADE, A., de TAPIA, M., DIDIERJEAN, L., BURKARD, G. Biological function of bean pathogenesis-related (PR3 and PR4) proteins. **Plant Science**, v. 63: p. 121-130, 1989.
- AWADE, A., METZ-BOUTIGUE, M. H., LERET, M., TENOT, G., AMIRI, I., BURKARD, G. The complete amino acid sequence of the pathogenesis-related

- (PR2) protein induced in chemically stressed bean leaves. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1077: p. 241-244, 1991.
- BAIROCH, A. **PROSITE: A dictionary of protein sites and patterns**, 5th release. University of Geneva, 1990.
- BARNA, B., IBENTHAL, W. D., HEITEFUSS, R. Extracellular RNase activity in healthy and rust-infected wheat leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35: p. 151-160, 1989.
- BELL, E. A. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: **The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise**. CONN, E. E. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 7 (Secondary plants products), p. 1-19, 1981.
- BELL, J. N., RYDER, T. B., WINGATE, V. P. M., BAILEY, J. A., LAMB, C. J. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and an incompatible plant-pathogen interaction. **Molecular Cell Biology**, v. 6: p. 1615-1623, 1986.
- BENT, A, KUNKEL, B., DAHLBECK, D., BROW, K., SCHMIDT, R., GIRAUDAT, J., LEUNG, J., STASKAWICZ, B. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science**, v. 265: p. 1856-1860, 1994.
- BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, v. 8: p. 1757-1771, 1996.
- BISHOP, J. G., DEAN, A. M., MITCHELL-OLDS, T. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant pathogen coevolution. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 97: p. 5322-5327, 2000.
- BOL, J. F., BUCHEL, A. S., KNOESTER, M., BALADIN, T., VAN LOON, L. C., LINTHORST, H. J. M. Regulation of the expression of plant defense genes. In: **Plant Hormone Signal Perception and Transduction**, SMITH, A.R. (Ed.), Dordrecht: Kluwer Academic, p. 135-139, 1996.
- BORÉM, A. e CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas Gerais**. VIEIRA, C., TRAZILBO, P. Jr., BORÉM, A. (eds.). Editora UFV, Viçosa, p. 13-17, 1998.
- BREITENEDER, H., PETTENBURGER, K., BITO, A., VALENTA, R., KROFT, D., RUMPOLD, H., SCHEINER, O., BREITENBACH, M. The gene coding for the major birch pollen allergen *Betv1* is highly homologous to a pea disease resistance response gene. **EMBO Journal**, v. 8: p. 1935-1938, 1989.
- CARR, J. P. e KLESSING, O. F. The pathogenesis related proteins of plants. In: **Genetic Engineering - Principles and Methods**, SETLOW, J. K. (ed.), Vol. II, Plenum Press, New York, 1990.
- CERVONE, F., HAHN, M. G., DE LORENZO, G., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions, XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. **Plant Physiology**, v. 90, n. 2, p. 542-548, 1989.
- CHOMCZYNSKI, P. e SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 172: p. 156-159, 1987.

- COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 69: p. 2110, 1972.
- COLLINS, M. K. L. e RIVAS, A. L. The control of apoptosis in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, v.18: p.307-309, 1993.
- CORBIN, D. R., SAUER, N., LAMB, C. J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. **Molecular Cell Biology**, v. 7: p. 6337-6344, 1987.
- CRAMER, C. L., BELL, J. N., RYDER, T. B., BAILEY, J. A., SCHUCH, W., BOLWELL, G. B., ROBBINS, M. P., DIXON, R. A., LAMB, C. J. Coordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic-enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L). **EMBO Journal**, v. 4: p. 285-289, 1985.
- CROFT, K. P. C., VOISEY, C. R., SLUSARENKO, A. J. Mechanism of hypersensitive cell collapse: Correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Red Mexican inoculated with avirulent race 1 cells of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 36: p. 49-62, 1990.
- CROFT, K. P. C., JUTTNER, F., SLUSARENKO, A. J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant Physiology**, v. 101: p. 13-24, 1993.
- DIXON, R. A., DEY, P. M., LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 55: p. 1-136, 1983.
- DIXON, R. A., HARRISON, M. J., LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479-501, 1994.
- DIXON, R. A., LAMB, C. J., PAIVA, N. L., MASOUD, S. Improvement of natural defense responses. **Annals of New York Academy of Sciences**, p. 126-139, 1996.
- DRON, M., CLOUSE, S. D., LAWTON, M. A., DIXON, R. A., LAMB, C. J. Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 85: p. 6738-6742, 1988.
- EDINGTON, B. V., LAMB, C. J., DIXON, R. cDNA cloning and characterization of a putative 1,3-beta-D-glucanase transcript induced by fungal elicitor in bean cell suspension cultures. **Plant Molecular Biology**, v. 16: p. 81-94, 1991.
- EDWARDS, K., CRAMER, C. L., BOLWELL, G. B., DIXON, R. A., SCHUCH, W., LAMB, C. J. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 82: p. 6731-6735, 1985.
- EIBEN, H. G. e SLUSARENKO, A. J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **The Plant Journal**, v. 5: p. 123-135, 1994.

- FALEIRO, F. G., PAULA Jr., T. J., BARROS, E. G., FREITAS, M. A. S., MOREIRA, M. A. Resistência de cultivares de feijoeiro comum a *Uromyces appendiculatus* da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21: p. 123-125, 1996.
- FALEIRO, F. G. **Identificação de raças, diversidade genética de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* e herança da resistência no feijoeiro**. Dissertação de M.S., Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 65 p., 1997.
- FALEIRO, F. G., VINHADELLI, W. S., RAGAGNIN, V. A., PAULA JR., T. J., MOREIRA, M. A., STAVELY, J. R., BARROS, E. G. Resistência de variedades de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus*. **Revista Ceres**, v. 46: p. 11-18, 1999.
- FALEIRO, F. G., VINHADELLI, W. S., RAGAGNIN, V. A., CORRÊA, R. X., MOREIRA, M. A., de BARROS E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genet. Mol. Biol.**, v. 23: p. 399-402, 2000.
- FARMER, E. E. e RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, v. 4: p. 129-134, 1992.
- FLOR, H. H. Inheritance of reaction to rust in flax. **J. Agric. Res.**, v. 74: p. 241-262, 1947.
- FLOR, H. H. The complementary genetic system in flax and flax rust. **Adv. Genet.**, v. 8: p. 29-54, 1956.
- FLOR, H. H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9: p. 275-296, 1971.
- FRISTENSKY, B., HOROVITZ, D., HADWIGER, L. A. cDNA sequences for pea disease resistance response genes. **Plant Molecular Biology**, v. 11: p. 713-715, 1988.
- FROHMAN, E. M., FROHMAN, T. C., VAYUVEGULA, B., GUPTA, S., VANDENNOORT, S. Vasoactive intestinal polypeptide inhibits the expression of the MHC class-II antigens on astrocytes. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 88: p. 339-346, 1988.
- GAUDET, D. A., LAROCHE, A., FRICK, M., DAVOREN, J., PUCHALSKI, B., ERGON, A. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57: p. 15-24, 2000.
- GROTH, J. V. e OZMON, E. A. Contrasting effects of asexual reproduction and random mating on changes in virulence frequency in a field collection of *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, v. 84: p. 566-569, 1994.
- HALEY, S. D., AFANADOR, L., KELLY, J. D. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. **Crop Science**, v. 34: p.1061-1066, 1994.
- HEDRICK, S. A., BELL, J. N., BOLLER, T., LAMB, C. J. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. **Plant Physiology**, v. 86: p. 182-186, 1988.

- HELLER, W. e HAHNBROCK, K. Highly purified "flavone synthase" from parsley catalyses the formation of naringenin chalcone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 200: p. 617-619, 1980.
- HUNTER, T. e KARIN, M. The regulation of transcription by phosphorylation. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 375-387, 1992.
- JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase - regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v. 23: p. 1349-1360, 1984.
- JUNQUEIRA NETO, A., ATHOW, K. L., VIEIRA, C. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *phaseoli*, no Estado de Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 16: p. 1-9, 1969.
- KANAZIN, V., MAREK, L. F., SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 93: p. 11746-11750, 1996.
- KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24: p. 447-463, 1990.
- KEEN, N. T. e YOSHKAWA, M. β -1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiology**, v. 71: p. 460-465, 1983.
- KEPPLER, L. D. e NOVACKY, A. Involvement of lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive response. **Phytopathology**, v. 76: p. 104-108, 1986.
- KOCH, E., MEIER, B. M., EIBEN, H. G., SLUSARENKO, A. J. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. **Plant Physiology**, v. 99: p. 571-576, 1992.
- KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **Plant Cell**, v. 8: p. 1.711-1.722, 1996.
- KREUZALER, F., RAGG, H., FAUTZ, E., KUHN, D. N., HAHNBROCK, K. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 80: p. 2591-2593, 1983.
- LAMB, C. J. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. **Cell**, v. 76: p. 419-422, 1994.
- LAWRENCE, G., FINNEGAN, E. J., AYLIFFE, M., ELLIS, J. The L^6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. **Plant Cell**, v. 7: p. 1995-1206, 1995.
- LAWTON, M. A. e LAMB, C. J. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. **Molecular Cell Biology**, v. 7: p. 335-341, 1987.
- LINTHORST, H. J. M., MELCHERS, L. S., MAYER, A., VANROEKEL, J. S. C., CORNELISSEN, B. J. C., BOL, J. F. Analysis of gene families encoding acidic and basic beta-1,3-glucanases of tobacco. **Proceedings of the National Academy Of Sciences - USA**, v. 87: p 8756-8760, 1990.
- MAHÉ, A., GRISVARD, J., DRON, M. Fungal- and plant-specific gene markers to follow the bean anthracnose infection process and normalize a bean chitinase mRNA induction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5: p. 242-248, 1992.

- MARGIS-PINHEIRO, M., METZ-BOUTIGUE, M. H., AWADE, A., de TAPIA, M., le RET, M., BURKARD, G. Isolation of a complementary DNA encoding the bean PR4 chitinase: an acidic enzyme with an amino-terminus cysteine-rich domain. **Plant Molecular Biology**, v. 17: p. 243-253, 1991.
- MARTIN, G. B., BROMMONSCHENKEL, S. H., CHUNWONGSE, J., FRARY, A., GANAL, M. W., SPIVEY, R., WU, T., EARLE, E. D., TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v. 262: p. 1432-1436, 1993.
- MATTON, D. P. e BRISSON, N. Cloning, expression and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 2: p. 325-331, 1989.
- MAUCH, F., HADWIGER, K. A., BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two 1,3-beta-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiology**, v. 87: p. 325-333, 1988a.
- MAUCH, F., MAUCH-MANI, B., BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of growth by combinations of chitinase and 1,3-beta-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88: p. 936-942, 1988b.
- MAUCH, F. e STAEHELIN, L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and beta-1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, v. 1: p. 447-457, 1989.
- MEHDY, M. C. e LAMB, C. J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. **EMBO Journal**, v. 6: p. 1527-1533, 1987.
- MEIER, B. M., SHAW, N., SLUSARENKO, A. J. Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v. 6: p. 453-466, 1993.
- MELAN, M., DONG, S., ENDARA, M., DAVIS, K. R., AUSUBEL, F. M., PETERMAN, T. K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 101: p. 441-450, 1992.
- MOISEYEV, G. P., BEINTEMA, J. J., FEDOREYEVA, L. I., YAKOVLEV, G. I. High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. **Planta (Heidelb.)**, v. 193: p. 470-472, 1994.
- MORA-NUÑES, O. A., VIEIRA, C., ZAMBOLIM, L. Variedades diferenciadoras de feijão para identificação de raças fisiológicas de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. **Revista Ceres**, v. 39: p. 391-404, 1992.
- NUSS, L., MAHÉ, A., CLARK, A. J., GRISVAR, J., DRON, M., CERVONE, F., De Lorenzo, G. Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48: p. 83-89, 1996.

- PAULA Jr., T. J. e ZAMBOLIM, L. Doenças. In: **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas Gerais**. VIEIRA, C., TRAZILBO, P. Jr., BORÉM, A. (eds.). Editora UFV, Viçosa, p. 375-433, 1998.
- RAMALHO, M. A. P. e ABREU, A. F. B. Cultivares. In: **Feijão: Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas Gerais**. VIEIRA, C., TRAZILBO, P. Jr., BORÉM, A. (eds.). Editora UFV, Viçosa, p. 435-450, 1998.
- RIVKIN, M. I., VALLEJOS, C. E., McCLEAN, P. E. Disease-resistance related sequences in common bean. **Genome**, v. 42: p. 41-47, 1999.
- RONALD, P. C., SALMERON, J. M., CARLAND, F. M., STASKAWICZ, B. J. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. **Journal of Bacteriology**, v. 174: p. 1604-1611, 1992.
- ROZEN, S. e SKALETISKY, H. J. Software: Primer3, 1998. http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primers3.html
- RYALS, J., UKNES, S., WARD, E. Systemic acquired-resistance. **Plant Physiology**, v. 104: p. 1109-1112, 1994.
- RYDER, T. B., CRAMER, C. L., BELL, J. N., ROBBINS, M. P., DIXON, R. A., LAMB, C. J. Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 81: p. 5724-5728, 1984.
- RYDER, T. B., HEDRICK, S. A., BELL, J. N., LIANG, X., CLOUSE, S. D., LAMB, C. J. Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. **Mol. Gen. Genet**, v. 210: p. 219-233, 1987.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2. ed., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 74: p. 5463-5467, 1977.
- SARTORATO, A. e RAVA, C. A. **Principais Doenças do Feijoeiro Comum e seu Controle**. Brasília: EMBRAPA, 300p., 1994.
- SCHMIDT, C. S. e WOLF, G. A. Cellulase in the host-parasite system *Phaseolus vulgaris* (L.) – *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Link. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105: p. 285-295, 1999.
- SCHLUMBAUM, A., MAUCH, F., VOGELI, U. L., BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324: p. 365-367, 1986.
- SHARMA, Y. K., HINOJOS, C. M., MEHDY, M. C. cDNA cloning, structure, and expression of a novel pathogenesis-related protein in bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5: p. 89-95, 1992.
- SLUSARENKO, A. J., CROFT, K. P. C., VOISEY, C. R. Biochemical and molecular events in the hypersensitive response of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Host-Pathogen Interactions**. SMITH, C. J. (ed.) Clarendon Press, Oxford., p. 126-143, 1991.

- SLUSARENKO, A. J., MEIER, B. M., CROFT, K. P. C., EIBEN, H. G. Lipoxygenase in plant disease. **In: Mechanisms of Plant Defense Responses**. FRITIG, B., GEGRAND, M. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 211-220, 1993.
- SOKOLOV, B. P. e PROCKOP, D. J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, v. 22: p. 4009-4015, 1994.
- SOMSSICH, I. E., SHMELZER, E., KAWALLECK, P., HAHLOCK, K. Gene structure and *in situ* transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. **Mol. Gen. Genet.**, v. 213: p. 93-98, 1988.
- STASKAWICZ, B. J., AUSEBEL, F. M., BAKER, B. J., ELLIS, J. G., JONES, D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268: p. 661-667, 1995.
- STAVELY, J. R., FREYTAG, G. F., STEADMAN, J. R., SCHWARTZ, H. F. The 1983 bean rust workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 26: p. iv-vi, 1983.
- STAVELY, J. R., PASTOR-CORRALES, M. A. Rust. **In: Bean production problems in the tropics**. SCHWARTZ, H. F., PASTOR-CORRALES, M. A. (Eds.). 2. ed. Cali: CIAT, p.159-194, 1989.
- STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie (Paris)**, v. 75: p. 687-706, 1993.
- De TAPIA, M., BERGMANN, P., AWADE, A., BURKARD, G. Analysis of acid extractable bean leaf proteins induced by mercuric chloride treatment and alfalfa mosaic virus infection: Partial purification and characterization. **Plant Science**, v. 45: p. 167-177, 1986.
- De TAPIA, M., DIETRICH, A., BURKARD, G. *In vitro* synthesis and processing of a bean pathogenesis-related (PR4) protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 166: p. 559-563, 1987.
- TEMPLETON, M. D. e LAMB, C. J. Elicitors and defence gene activation. **Plant Cell Environ.**, v. 11: p. 395-401, 1988.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. **Germplasm Resources Information Network (GRIN)**. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/dno_eval_acc.pl?83042+490345+19 (03 May, 2001).
- VAN DEN BULCKE, M. BAUW, G., CASTRESANA, C., VAN MONTAGU, M., VANDEKERCKHOVE, J. Characterization of vacuolar and extracellular beta (1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 86: p. 2673-2677, 1989.
- VAN LOON, L. C., PIERPOINT, W. S., BOLLER, T., CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 12: p. 245-264, 1994.
- VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. Imprensa Universitária, Viçosa, MG, UFV. 231p.1983.

- VOGELI, U. L., MEINS, F., BOLLER, T. Coordinated regulation of chitinase and 1,3-beta-glucanase in bean leaves. **Planta**, v. 174: p. 364-372, 1988.
- WALTER, M. H., GRIMA-PETTENATI, J., GRAND, C., BOUDET, A. M., LAMB, C. J. Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 85: p. 5546-5550, 1988.
- WALTER, M. H., LIU, J.-W., GRAND, C., LAMB, C. J., HESS, D. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. **Mol. Gen. Genet.**, v. 222: p. 353-360, 1990.
- WALTER, M. H., LIU, J. W., WUNN, J., HESS, D. Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr10*) display complex patterns of developmental, dark induced and exogenous-stimulus-dependent expression. **European Journal of Biochemistry**, v. 239: p. 281-293, 1996.
- WHITHAM, S., DINESH-KUMAR, S. P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C., BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and interleucin-1 receptor. **Cell**, v. 78: p. 1.101-1.115, 1994.
- ZHANG, S. e METHDY, M.C. Binding of a 50-kD protein to a U-rich sequence in a mRNA encoding a proline-rich protein that is destabilized by fungal elicitor. **Plant Cell**, v. 6: p. 135-145, 1994.