

MATEUS RODRIGUES PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM
FOLHAS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RESPOSTA A *Phakopsora
pachyrhizi***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436i
2011

Pereira, Mateus Rodrigues, 1978-

Identificação de proteínas diferencialmente expressas em
folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em resposta a
Phakopsora pachyrhizi / Mateus Rodrigues Pereira. – Viçosa,
MG, 2011.

ix, 45f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Proteômica. 2. Espectrometria de massas. 3. Eletroforese.
4. Ferrugem da soja. 5. Ferrugem asiática. 6. Soja - Doenças
e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

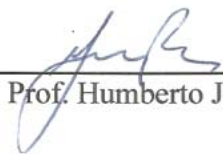
CDD 22. ed. 571.2

MATEUS RODRIGUES PEREIRA

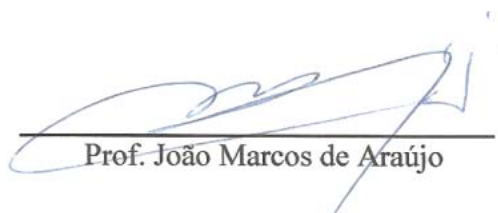
**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM
FOLHAS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RESPOSTA A *Phakopsora
pachyrhizi***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2011.



Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos



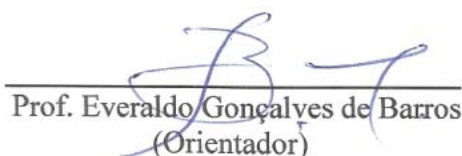
Prof. João Marcos de Araújo



Dr.ª. Meire de Oliveira Barbosa



Prof. José Marcello Salabert de Campos



Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

A Deus
À minha esposa Elaine.
Aos meus pais Gilberto e Marilene
Aos meus irmãos Tiago e Raquel

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, o autor da vida e da ciência, por Ele estar sempre comigo vencendo as barreiras por mim.

À minha querida esposa Elaine que sempre orou comigo, dando-me apoio e forças para juntos vencermos.

Aos meus incomparáveis pais Gilberto e Marilene, pelas fundamentais orações, pelo amor por mim e por sempre me mostrarem o caminho certo a seguir.

Aos meus irmãos Tiago e Raquel pelas orações e por estarem na arquibancada da vida torcendo por mim.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros pela competente orientação, pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança e amizade.

Ao amigo e Professor Humberto Josué de Oliveira Ramos que sempre esteve disposto a me ajudar e a transmitir seus conhecimentos sem medir esforços, pelas críticas e sugestões que foram fundamentais para minha formação.

Aos professores Maurílio Alves Moreira e Maria Cristina Baracat-Pereira pela co-orientação.

Aos amigos do laboratório: Bianca, Fernanda, Márcia, Arlindo, Renato, Carla, Leandro, Marcão, Pedro e Isadora, pelo excelente convívio e pelo apoio constante.

Aos amigos e funcionários: Gláucia, Naldo, Edvaldo e Cássio que sempre estenderam a mão quando precisamos.

A todos que com amizade e companheirismo contribuíram para que mais esta etapa fosse vencida.

BIOGRAFIA

MATEUS RODRIGUES PEREIRA, filho de Gilberto Pereira Marques e Marilene Rodrigues Vicente Marques, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 22 de agosto de 1978.

De 1994 a 1996, cursou o Ensino Médio no Colégio Sagrado Coração de Maria em Ubá, Minas Gerais.

Em maio de 1999 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), colando grau em março de 2003.

Em agosto de 2003, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Genética Molecular e Melhoramento Vegetal, defendendo tese em julho de 2005.

Em agosto de 2007, ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na UFV, defendendo tese em julho de 2011.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1.0. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.0. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. A Cultura da Soja e a Ferrugem Asiática.....	2
2.2. Interações Moleculares Hospedeiro-Patógeno.....	3
2.3. Procedimentos Experimentais em Análise Proteômica.....	5
2.3.1. Separação de Proteínas por Eletroforese Bidimensional (2DE).....	5
2.3.2. Espectrometria de Massas (MS).....	5
3.0. OBJETIVO GERAL.....	7
Referências Bibliográficas.....	8

Capítulo 1 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM FOLHAS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RESPOSTA A *Phakopsora pachyrhizi*.

1.0. INTRODUÇÃO.....	12
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. Material vegetal e Inoculação com Esporos de <i>P. pachyrhizi</i>	14
2.2. Extração de Proteínas.....	15
2.3. Separação de Proteínas Totais por Eletroforese Bidimensional (2D-SDS-PAGE).....	16
2.3.1. Reidratação das Tiras de Gel da Primeira Dimensão.....	16
2.3.2. Focalização Isoelétrica (IEF).....	16
2.3.3. Equilíbrio das Tiras de Gel.....	16
2.3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	17
2.3.5. Análise da Expressão de Proteínas.....	17
2.4. Tripsinização de Proteínas em Gel	17
2.5. Espectrometria de Massas e Identificação das Proteínas.....	18
3.0. RESULTADOS.....	19
4.0. DISCUSSÃO.....	25
5.0. CONCLUSÕES.....	30
Referências Bibliográficas.....	31

Capítulo 2 - ANÁLISE *IN SILICO* DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE SOJA EM RESPOSTA A *Phakopsora pachyrhizi*.

1.0. INTRODUÇÃO.....	38
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.0. CONCLUSÕES.....	43
Referências Bibliográficas.....	44

RESUMO

PEREIRA, Mateus Rodrigues, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.

Identificação de proteínas diferencialmente expressas em folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em resposta a *Phakopsora pachyrhizi*. Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-orientadores: Maurilio Alves Moreira e Maria Cristina Baracat-Pereira.

A ferrugem asiática da soja (FAS), cujo agente causal é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, é considerada uma das doenças mais agressivas à cultura, pois ainda não há cultivares comerciais imunes ao patógeno. O mecanismo de controle da doença mais utilizado é o uso de fungicidas, o que aumenta o custo de produção e acarreta em problemas ambientais. O controle das doenças de plantas por meio de resistência genética é a forma mais eficaz e econômica. Estudos genômicos e proteômicos têm sido feitos para o entendimento molecular da resposta do hospedeiro ao patógeno, porém, ainda há poucas informações sobre a base molecular da interação entre o agente causal da FAS e a soja, as quais são necessárias para assistir o melhoramento genético no desenvolvimento de cultivares resistentes. Neste trabalho, por meio do uso da eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas, foram identificadas dez proteínas diferencialmente expressas em folhas de soja em resposta à inoculação com esporos de *P. pachyrhizi*. Foram avaliados dois genótipos (PI561356 com resistência parcial e Embrapa 48, suscetível) em dois tempos após a inoculação (72h e 192h). Para cada tempo e genótipo foram coletadas folhas de plantas controle não inoculadas. A anidrase carbônica, 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR) e subunidade A da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDHa) foram mais expressas no genótipo suscetível 192 h após inoculação (h.a.i.) quando comparado ao controle. No tempo de 72 h.a.i., foram identificadas sete proteínas diferencialmente expressas quando o genótipo resistente inoculado foi comparado ao não inoculado: proteína tumoral controlada traducionalmente, gama glutamil hidrolase, proteína ribossomal 30S de cloroplasto, fator de elongação 1-alfa, proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco (menos expressas no inoculado), glutamina sintetase e frutose bisfosfato aldolase (mais expressas no inoculado). Algumas destas estão envolvidas com rotas metabólicas de defesa do hospedeiro ao ataque de patógenos. Estudos prévios indicam que a anidrase carbônica é uma das proteínas efetoras do ácido salicílico (AS) que exerce um importante papel nas respostas de defesa local e sistêmica. Outros trabalhos demonstram que a enzima DXR é ponto-chave na rota de síntese de fitoalexinas que são isoprenóides envolvidos na defesa contra ataque de patógenos. A frutose bisfosfato aldolase participa do metabolismo das pentoses fosfato,

que é uma das vias principais para a produção de compostos fenólicos responsáveis pela ativação de mecanismos de defesa. A glutamina sintetase atua no metabolismo de nitrogênio e estudos indicam que a redução nos níveis de nitrogênio aumenta a suscetibilidade a patógenos. O aumento da expressão de GAPDH α é uma evidência do acúmulo de intermediários reativos do oxigênio como parte de um dos mecanismos de resposta da resistência adquirida sistêmica (RAS) contra o ataque de patógenos. Em concordância com outros trabalhos, a fotossíntese e a síntese global de proteínas tendem a diminuir em certos tempos de inoculação, o que observamos quando a proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco, a proteína ribossomal 30S de cloroplasto e fator de elongação 1- α foram menos expressos no genótipo PI561356 72 h.a.i. Apesar do papel da proteína tumoral controlada traducionalmente, em resposta a infecção por patógenos, ser ainda desconhecido, foram observadas, em outros trabalhos, alterações na expressão desta proteína em resposta a diferentes condições fisiológicas da célula. A expressão de proteínas da seiva do xilema pode ser alterada como foi o caso da gama glutamil hidrolase menos expressa no genótipo PI561356 72 h.a.i. Resultados de outros trabalhos mostram que alterações na expressão de proteínas da seiva do xilema inibem o desenvolvimento de patógenos em plantas. Os genes que codificam as enzimas anidrase carbônica e DXR, que foram mais expressas em folhas de soja no genótipo Embrapa 48, 192 h.a.i., foram também analisados *in silico*. A expressão destes genes foi detectada em bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tags*) de folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. Estes resultados contribuem para o aumento das informações necessárias ao entendimento do mecanismo de resposta da soja a *P. pachyrhizi*.

ABSTRACT

PEREIRA, Mateus Rodrigues, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2011.
Identification of proteins differentially expressed in leaves of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in response to *Phakopsora pachyrhizi*. Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisors: Maurilio Alves Moreira and Maria Cristina Baracat-Pereira.

Asian soybean rust (ASR), caused by *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, is considered one of the most aggressive diseases to the soybean culture, since there are no commercial cultivars immune to the pathogen. The use of fungicides is the most commonly applied control measure against the disease, but this procedure increases production cost and causes environmental problems. Plant disease control through genetic resistance is the most inexpensive and effective alternative. Genomic and proteomic studies have been carried out for molecular understanding of the host responses to pathogens, but there is little information on the molecular basis of the interaction between the ASR causal agent and soybean, which is needed for aiding genetic breeding efforts and the development of resistant cultivars. In this work, through the use of two-dimensional electrophoresis associated with mass spectrometry, ten proteins differentially expressed were identified in soybean leaves in response to inoculation with spores of *P. pachyrhizi*. Two genotypes (PI561356 with partial resistance and Embrapa 48, susceptible) were evaluated at two time points after inoculation (72 h and 192 h). Leaves of non-inoculated control plants were collected for each time and genotype. Carbonic anhydrase, 1-deoxy-D-Xylulose-5-phosphate-reductoisomerase (DXR) and subunit A of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDHa) were more abundantly expressed in the susceptible genotype 192 h after inoculation (h.a.i.), compared to the control. At the time point of 72 h.a.i., seven proteins differentially expressed were identified when the inoculated resistant genotype was compared to the non-inoculated: translationally controlled tumor protein, gamma-glutamyl hydrolase, chloroplast 30S ribosomal protein, elongation factor 1-alpha, Rubisco beta subunit binding protein (lower expression with inoculation), glutamine synthetase and fructose biphosphate aldolase (higher expression with inoculation). Some of these proteins are involved in metabolic pathways related with host defense against pathogens. Previous studies indicate that carbonic anhydrase is a salicylic acid (SA) effector protein that plays an important role in systemic and local defense responses. Other studies demonstrate that the enzyme DXR is essential for phytoalexins biosynthesis. These compounds are isoprenoids involved in the defense against

pathogen attack. The fructose biphosphate aldolase participates in the pentose phosphate metabolism, which is one of the main pathways for production of phenolic compounds responsible for the activation of defense mechanisms. Glutamine synthetase acts on nitrogen metabolism, and studies indicate that reduced levels of nitrogen increase susceptibility to pathogens. The increased expression of GAPDH α indicates that accumulation of reactive oxygen intermediates is part of the response mechanisms of the systemic acquired resistance (SAR) against pathogen attack. Several studies show that photosynthesis and global protein synthesis tend to decrease after pathogen inoculation. This is in line with the observation that the Rubisco beta subunit binding protein, the chloroplast 30S ribosomal protein and elongation factor 1- α were less expressed in the genotype PI561356 72 h.a.i. Although the role of the translationally controlled tumor protein on response to infection by pathogens is still unknown, changes in the expression of this protein have been observed in other works, in response to different physiological conditions of the cell. The expression of proteins present in the xylem sap can be changed, as occurred with the gamma-glutamyl hydrolase, which was less expressed in genotype PI561356 72 h.a.i. Results from other studies show that changes in the expression of proteins present in the xylem sap inhibit the development of pathogens in plants. The genes encoding the enzymes carbonic anhydrase and DXR, which were more expressed in soybean leaves in the genotype Embrapa 48, 192 h.a.i., were analyzed *in silico*. Their expression was detected in EST (Expressed Sequence Tags) libraries of soybean leaves inoculated with *P. pachyrhizi*. The results obtained in this work will help the understanding of the mechanism of soybean response to *P. pachyrhizi*.

1.0. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie da família Fabaceae, sendo considerada a cultura de maior importância econômica no mundo. Entre os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos em soja, estão as doenças, gerando perdas anuais de produção estimadas entre 15% e 20% (Embrapa Soja, 2011). A ferrugem asiática da soja (FAS), cujo agente causal é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, é considerada uma das doenças mais agressivas à cultura da soja em função dos prejuízos causados e do aumento de custo de produção para o seu controle, pois ainda não há cultivares comerciais imunes ao patógeno e o mecanismo de controle da doença mais utilizado é o uso de fungicidas. O controle das doenças de plantas por meio da resistência genética é a forma mais eficaz e econômica. Estudos têm sido feitos para o entendimento da resposta do hospedeiro ao patógeno em nível molecular (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009; Mortel et al., 2007; Júnior, 2007; Choi et al., 2008; Tremblay et al., 2010; Goellner et al., 2010; Cooper et al., 2011), porém, ainda há poucas informações sobre esta interação (Mortel et al., 2007; Pham et al., 2009; Tremblay et al., 2010), as quais são necessárias para o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença, o que forneceria ferramentas para programas de melhoramento genético para a criação de cultivares de soja resistentes à doença (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009).

O conhecimento adquirido por meio de estudos bioquímicos do genoma e do proteoma das espécies tem sido um importante foco para a busca de alternativas para o controle de pragas e doenças. O proteoma corresponde ao perfil completo de proteínas expressas em um organismo, tecido ou célula, em uma determinada situação fisiológica. A análise proteômica corresponde à avaliação sistemática do proteoma possibilitando a identificação de proteínas diferencialmente expressas em tecidos sob diferentes condições fisiológicas (Wilkins et al., 1995). A identificação de proteínas diferencialmente expressas em situações de estresse biótico permite identificar os genes envolvidos em suas sínteses, podendo auxiliar programas futuros de manipulação genética na criação de plantas resistentes a patógenos. Este trabalho objetivou identificar proteínas diferencialmente expressas em folhas de soja em resposta a *P. pachyrhizi*.

2.0. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cultura da Soja e a Ferrugem Asiática

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie originária da Ásia e vem sendo cultivada a centenas de anos. O cultivo se expandiu por várias partes do mundo, constituindo-se, atualmente, um dos principais. É uma cultura de clima tropical, cuja produção é mais concentrada nos Estados Unidos e no Brasil pelas condições ambientais favoráveis ao seu cultivo (Embrapa Soja, 2011). É a segunda cultura mais importante dos Estados Unidos contribuindo com 19 bilhões de dólares anuais para a economia daquele país (Panthee et al., 2009). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo a cultura de maior área cultivada, tendo ocupado 23,6 milhões de hectares na safra 2009/2010, com uma produção de 68,7 milhões de toneladas (Embrapa Soja, 2011).

Entre os principais fatores que limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção de soja, destacam-se as doenças (Juliatti et al., 2005). Mundialmente, são listadas mais de 100 doenças na cultura da soja (Sinclair e Backman, 1989), das quais aproximadamente 50 já foram identificadas no Brasil (Silva et al., 2007). As perdas anuais de produção por doenças são estimadas entre 15% e 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (Embrapa Soja, 2011).

A ferrugem asiática da soja (FAS), incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, constitui-se em um dos principais problemas fitossanitários da cultura (Juliatti et al., 2003). Foi descrita pela primeira vez no Japão, em 1902. Por volta de 1914, surgiu, em caráter epidêmico, em vários países no sudoeste da Ásia. Na Austrália, apareceu na década de 90, mas não atingiu proporções de epidemia, e no fim da década de 90, a doença foi constatada na África (Balardin, 2004). A FAS foi constatada no Brasil, pela primeira vez, em Lavras – MG, em 1979. A partir de 2001, esta doença tornou-se um dos problemas mais relevantes da agricultura brasileira, em razão das reduções de produtividade e dos gastos com medidas de controle, considerando-se a importância da cultura da soja para o país (Yorinori et al., 2005).

A FAS possui alto potencial de dano à cultura, pois pode causar rápido amarelecimento e queda prematura de folhas, prejudicando a plena formação dos grãos (Soares et al., 2004). Em casos mais severos, quando a doença atinge a cultura na fase de formação das vagens ou no início da formação dos grãos, pode ocorrer a queda das vagens, resultando em comprometimento total do rendimento (Azevedo et al., 2004). Sob condições favoráveis e dependendo do tempo de infecção, a FAS pode causar perdas de até 80% da produção (Dorrance et al., 2005; Embrapa Soja, 2011).

Ainda não foram identificados germoplasmas com resistência genética suficiente que permita o desenvolvimento de cultivares que dispensem o uso de fungicidas para o controle da doença (Tecnologias, 2008). Até o momento, cinco genes de resistência foram descritos em soja: *Rpp1* (Cheng and Chan, 1968; Hidayat and Somaatmadja, 1977), *Rpp2* (Hidayat and Somaatmadja, 1977), *Rpp3* (Bromfield and Hartwig, 1980), *Rpp4* (Hartwig, 1986) e *Rpp5* (Garcia et al., 2008). A eficiência destes genes é limitada (parcial) devido à virulência e variabilidade do patógeno. Estas fontes de resistência identificadas são específicas a certas raças do patógeno (Bonde et al., 2006). Ainda não há cultivares comerciais imunes ao patógeno e o mecanismo de controle da doença mais utilizado é o uso de fungicidas, o que aumenta o custo de produção e acarreta em problemas ambientais (Miles et al., 2006).

2.2. Interações Moleculares Hospedeiro-Patógeno

O controle das doenças de plantas por meio da resistência genética é a forma mais eficaz e econômica. Estudos têm sido feitos para a obtenção do entendimento da resposta do hospedeiro ao patógeno em nível molecular. Entender a resposta do hospedeiro ao patógeno em nível molecular é certamente importante para o controle da doença. É importante estudar os genes da soja expressos diferencialmente em resposta ao *P. pachyrhizi* para entender os mecanismos de desenvolvimento da doença e de resposta do hospedeiro. Isto certamente fornece ferramentas para programas futuros de melhoramento genético para a construção de cultivares de soja imunes à doença (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009). Há poucas informações sobre a base molecular da interação entre o agente causal da ferrugem asiática e a soja, as quais são necessárias para assistir esforços futuros do desenvolvimento de resistência efetiva (Mortel et al., 2007; Pham et al., 2009; Tremblay et al., 2010).

Mortel et al. (2007) analisaram as mudanças nas quantidades de mRNA expressos em folhas de soja infectadas com a ferrugem asiática, relativas às plantas não infectadas. A avaliação foi feita em 10 diferentes tempos entre plantas não infectadas (controle-*Mock*) e infectadas utilizando os genótipos resistente (PI230970) portador do gene *Rpp2* e o completamente susceptível (Embrapa-48). Utilizando o *GeneChip Soybean Genome Array* contendo sondas que representam 35.611 transcritos de células de folhas de soja, os pesquisadores avaliaram a expressão diferencial de transcritos nas plantas infectadas comparando com as não-infectadas. Em ambos os genótipos houve detecção de transcritos que foram expressos em plantas infectadas e que são de resposta à doença. Houve uma resposta bifásica semelhante de expressão de transcritos para os

dois genótipos e de acordo com o tempo de inoculação. Os pesquisadores detectaram a expressão de genes envolvidos no metabolismo secundário (nas vias de biossíntese de flavonóides que estão envolvidos na resposta de defesa de plantas) e fatores de transcrição associados com a resposta ao estresse biótico.

Panthee et al. (2007), utilizando técnicas de RT *real time* PCR e *Affymetrix microarrays of soybean*, apresentaram um perfil do transcriptoma de plantas jovens de soja (estágio V2 de desenvolvimento – após três semanas de plantio) do cultivar 5601T inoculadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*. A observação foi feita após 72 horas de inoculação e comparada com o perfil das plantas não inoculadas. Um total de 112 genes foram detectados sendo diferencialmente e significativamente expressos como consequência da infecção pelo patógeno. Destes, 46 são *Up*-regulados e 66 são *Down*-regulados. A maioria dos genes *up*-regulados tem função de defesa e funções relacionadas a estresse.

Panthee et al. (2009) ressaltaram a importância de considerar o estágio de desenvolvimento do hospedeiro no estudo desta interação. Utilizando técnicas de RT *real time* PCR e *Affymetrix microarrays of soybean*, eles avaliaram o perfil do transcriptoma de células de folhas do cultivar de soja 5601T (suscetível) em dois estádios de desenvolvimento (V₄ e R₁) 72 horas após inoculação. No estágio V₄, 5.056 genes foram diferencialmente expressos enquanto 579 foram encontrados diferencialmente expressos em R₁.

Tremblay et al. (2010) avaliaram a diferença de expressão de transcritos em folhas do cultivar Williams 82 10 dias após inoculação e identificaram cerca de 100 transcritos com expressão diferencial significativa. Cooper et al. (2011) em um estudo de proteômica nuclear, avaliou dois cultivares soja: Williams 82 (W82) (Suscetível) e Williams 82/*Rpp1* (Resistente) inoculados com isolado Louisiana 4-1 para o qual o gene *Rpp1* apresenta resistência. Após 24 horas de inoculação eles observaram o aumento na expressão de 260 proteínas no cultivar portador do gene de resistência quando comparado ao suscetível.

Em todos estes trabalhos são observadas diferenças de expressão em genes potencialmente relacionados à defesa da soja ao *P. pachyrhizi*. Há o objetivo comum, em todas estas pesquisas, em fornecer informações sobre as repostas bioquímicas e fisiológicas do hospedeiro que venham facilitar programas genéticos futuros de desenvolvimento de plantas resistentes a este patógeno.

2.3. Procedimentos Experimentais em Análise Proteômica

2.3.1. Separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2DE)

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-SDS-PAGE) separa as proteínas de acordo com dois parâmetros físico-químicos, o ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão e a massa molecular na segunda dimensão. A metodologia associa a focalização isoelétrica (IEF) e a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (O'Farrell, 1975). As proteínas separadas por 2DE podem ser visualizadas por coloração com Coomassie blue, coloração por prata, corantes fluorescentes, detecção imunológica ou por radiomarcção (López, 2007). A capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa, e a possibilidade de se fazer análise da expressão gênica por meio da comparação entre perfis protéicos de diferentes situações fisiológicas, posiciona essa metodologia entre as principais ferramentas proteômicas. A separação e visualização de proteínas de um extrato bruto obtido de um tecido, organismo ou célula por 2DE seguida por sua identificação e caracterização por espectrometria de massas (MS), é o método mais comum para análises proteômicas atuais (Sarma et al., 2008).

A 2D-SDS-PAGE-MS (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida associada à espectrometria de massas) aplica-se, em geral, ao estudo comparativo da fisiologia celular, permitindo a identificação de proteínas já conhecidas, expressas em concentrações diferentes, por meio de análises de sua impressão digital (*mass-fingerprinting*) (James et al., 1993), que corresponde a um perfil de peptídeos obtidos pela proteólise (tripsinólise, em geral) da proteína em estudo (Henzel et al., 2003).

2.3.2. Espectrometria de Massas (MS)

A MS é uma técnica analítica que determina as massas moleculares com base no movimento de partículas carregadas em um campo elétrico ou magnético. As moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa e separadas de acordo com as suas relações de massa/carga (m/z) (Westermeyer e Naven, 2002). Um espectrômetro de massas é um instrumento constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Para serem separadas pelo campo eletromagnético, moléculas neutras devem ser ionizadas e convertidas à fase gasosa pela fonte ionizadora. As fontes de ionização empregadas em MS aplicada à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), tendo a função de ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e transferir as espécies a serem analisadas para a fase

gasosa. Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações m/z . Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido (Canas et al., 2006; Cantú et al., 2008).

Após a etapa de extração de proteínas de um tecido e separação pela 2DE, o próximo passo é converter estas proteínas isoladas em um conjunto de peptídeos. Isso é feito com o uso de enzimas (em geral, tripsina) que clivam as ligações peptídicas após resíduos de Arginina e Lisina. Os peptídeos obtidos são analisados por espectrometria de massas, sendo ionizados (ESI ou MALDI), transferidos para o analisador de massas (TOF, por exemplo) e detectados. O espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão enzimática é adquirido. Este resultado indica a relação m/z e, por consequência, a massa molecular dos peptídeos (Cantú et al., 2008). A lista de massas de peptídeos adquirida pode ser transferida para o software de busca MASCOT como arquivo de dados (Thiede et al., 2005). O programa correlaciona a lista de massas de peptídeos obtida experimentalmente com a lista de massas resultante da clivagem *in silico* de proteínas registradas em bancos de dados públicos (Chamrad et al., 2004; Elias et al., 2005). A este processo, que utiliza a massa molecular dos peptídeos tripticos para localizar proteínas em bancos de dados públicos, com o auxílio de softwares como o MASCOT, dá-se o nome de **PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*)**. O software MASCOT também correlaciona espectros de massas de fragmentação de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (Chamrad et al., 2004; Elias et al., 2005). A este processo, dá-se o nome de **PFF (*Peptide Fragment Fingerprinting*)**.

Devido à importância econômica da soja, alguns grupos já começaram a estudar o seu proteoma utilizando a espectrometria de massas (Mooney & Thelen, 2004; Hajduch et al., 2005; Xu et al., 2006; Batista et al., 2007; Natarajan et al., 2007; Krishnan et al., 2007).

3.0. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas em folhas de soja em resposta à inoculação por *Phakopsora pachyrhizi*. Para este fim, foram analisados os genótipos suscetível (Embrapa 48) e o parcialmente resistente (PI561356) em dois tempos distintos de inoculação (72 e 192 horas após inoculação).

Referências Bibliográficas

- Azevedo, L. A. S.; Juliatti, F. C.; Balardin, R. S.; Silva, O. C. da. **Programa Syntinela:** monitoramento da dispersão de *Phakopsora pachyrhizi* e alerta contra a ferrugem asiática da soja. Campinas: Emopi Gráfica e Editora. 2004, 24p. (Boletim Técnico).
- Balardin, R.S. A ferrugem asiática da Soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 29:19, 2004. Suplemento. Resumo.
- Batista, R.; Martins, I.; Jenö, P.; Ricardo, C.P.; Oliveira, M.M. A proteomic study to identify soya allergens - The human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. **International Archives of Allergy and Immunology**, 144:29-38, 2007.
- Bonde, M. R.; Nester, S.E.; Austin, C.N.; Stone, C.L.; Frederick, R.D.; Hartman, G.L.; Miles, M.R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, 90:708–716, 2006.
- Bromfield, K. R., and Hartwig, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, 20:254-255, 1980.
- Cañas, B.; López-Ferrer, D.; Ramos-Fernández, A.; Camafeita, E.; Calvo, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Briefings in functional genomics and proteomics**, 4:295-320, 2006.
- Cantú, M.D.; Carrilho, E.; Wulff, N.A.; Palma, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. **Química Nova**, 31(3):669-675, 2008.
- Chamrad, D. C.; Korting, G.; Stuhler, K.; Meyer, H. E.; Klose, J.; Bluggel, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, 4:619-628, 2004.
- Cheng, Y. W., and Chan, K. L. The breeding of ‘Tainung 3’ soybean. **J. Taiwan Agricultural Research**, 17:30-35, 1968.
- Choi, J.; Alkharouf, N.; Schneider, K.; Matthews, B.; Frederick, R. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Functional & Integrative Genomics**, 8:314–359, 2008.
- Cooper, B.; Campbell, K.B.; Feng, J.; Garrett, W.M. and Frederick, R. Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. **Molecular BioSystems**, 7:773–783, 2011.
- Dorrance, A.E.; Draper, M.A.; Rshman, D.E. **Using foliar fungicides to manage soybean rust: Economic importance of soybean rust**. Land Grant Universities Cooperating, NC-504, 2005.
- Elias, J. E.; Haas, W.; Faherty, B. K.; Gygi, S. P. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. **Nature Methods**, 2(9):667-675, 2005.
- Embrapa Soja: A soja. Londrina, 2011. Disponível em:

- <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16> Acesso em 20 de maio de 2011.
- Garcia A.; Calvo, E.S.; de Souza Kiihl, R.A.; Harada, A.; Hiromoto, D.M.; Vieira, L.G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 117:545–553, 2008.
- Goellner, K.; Loehrer, M.; Langenbach, C.; Conrath, U.W.E.; Koch, E.; Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, 11(2):169–177, 2010.
- Hajdуч, M.; Ganapathy, A.; Stein, J.W.; Thelen, J.J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, 137:1397–1419, 2005.
- Hartwig, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, 26:1135-1136, 1986.
- Henzel, W.J.; Watanabe, C.; Stults, J.T. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 14:931-942, 2003.
- Hidayat, O. O., and Somaatmadja, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, 1:9-22, 1977.
- James, P.; Quadroni, M.; Carafoli, E.; Gonnet, G. Protein identification by mass profile fingerprinting. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 195:58-64, 1993.
- Julliatti, F.C.; Borges, E.N.; Passos, R.R.; Caldeira Júnior, J.C.; Brandão, A.M. Doenças da soja. **Cultivar**, 47:3-14, 2003.
- Juliatti, F.C.; Polizel, A.C.; Balardin, R.S.; Vale, F.X.R. Ferrugem da soja: epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 13:351-395, 2005.
- Júnior, S.L.B. **Análise da expressão gênica induzida por *Phakopsora pachyrhizi* em soja**. Viçosa: UFV, 2007. 57p. Dissertação. Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.
- Krishnan, H.B.; Natarajan, S.S.; Mahmoud, A.A.; Nelson, R.L. Identification of glycinin and beta-conglycinin subunits that contribute to the increased protein content of high-protein soybean lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55:1839-1845, 2007.
- López, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography B**, 849:190-202, 2007.

- Miles, M. R.; Frederick, R. D.; Hartman, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2006-0104-01-RS. Published online. 2006.
- Mooney, B.P. & Thelen, J.J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. **Phytochemistry**, 65:1733–1744, 2004.
- Mortel, M.V. de; Recknor, J.C.; Graham, M.A.; Nettleton, D.; Dittman, J.D.; Nelson, R.T.; Godoy, C.V.; Abdelnoor, R.V.; Almeida, A.M.R.; Baum, T.J.; Whitham, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)**, 20:887-899, 2007.
- Natarajan, S.; Xu, C.; Bae, H.; Bailey, B.A. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. **Journal of Plant Physiology**, 164(6):756-763, 2007.
- Natarajan, S.; Xu, C.; Bae, H.; Bailey, B.A.; Cregan, P.; Caperna, T.J.; Garrett, W.M.; Luthria, D. Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45(6-7):436-444, 2007.
- O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 250:4007–4021, 1975.
- Panthee, D.R.; Yuan, J.S.; Wright, D. L.; Marois, J.J.; Mailhot, D.; Stewart Jr., C. N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional & Integrative Genomics**, 7:291–301, 2007.
- Panthee, D.R.; Marois, J.J.; Wright, D. L.; Narváez, D.; Yuan, J.S.; Stewart Jr., C. N. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. **Theoretical and Applied Genetics**, 118:359–370, 2009.
- Pham, T. A.; Miles, M. R.; Frederick, R. D.; Hill, C. B.; and Hartman, G. L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 93:224-228, 2009.
- Sarma, A.D.; Oehrle, N.W.; Emerich, D.W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, 379:192-195, 2008.
- Silva, V. A. S.; Juliatti, F. C.; Silva, L. A. S. Interação entre resistência genética parcial e fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(9):1261-1268, 2007.
- Sinclair, J.B.; Backman, P.A. **Compendium of soybean diseases**. APS Press, 3: 106p, 1989.

- Soares, R. M.; Rubin, S. A. L.; Wielewicki, A. P.; Ozelame, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, 34(4):1245-1247, 2004.
- Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 262p, 2008.
- Thiede, B.; Höhenwarter, W.; Krah, A.; Mattow, J.; Schmid, M.; Schmidt, F.; Jungblut, P.R. Peptide mass fingerprinting. **Methods**, 35:237–247, 2005.
- Tremblay, A.; Hosseini, P.; Alkharouf, N.W.; Li, S.; Matthews, B.F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, 179:183–193, 2010.
- Westermeyer, R.; Naven, T. **Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 317p. 2002.
- Wilkins, M. R.; Sanches, J.C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 13:19-50, 1995.
- Xu, C.; Garrett, W.M.; Sullivan, J.; Caperna, T.J.; Natarajan, S. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Phytochemistry**, 67:2431–2440, 2006.
- Yorinori, J.T.; Paiva, W.M.; Frederick, R.D.; Costamilan, L.M.; Bertagnolli, P.F.; Hartman, G.E.; Godoy, C.V.; Nunes Júnior, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, 89:675-677, 2005.

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM FOLHAS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) EM RESPOSTA A *Phakopsora pachyrhizi*

RESUMO: A ferrugem asiática da soja, cujo agente causal é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, é considerada uma das doenças mais agressivas à cultura da soja em função dos prejuízos causados e do aumento de custo de produção para o seu controle, pois ainda não há cultivares comerciais imunes ao patógeno e o mecanismo de controle da doença mais utilizado é o uso de fungicidas. Para uma maior compreensão da resposta do hospedeiro ao patógeno em nível molecular, foram analisados dois genótipos de soja (PI561356, com resistência parcial e Embrapa 48, suscetível) nos tempos de 72 horas e 192 horas após inoculação com esporos de *P. pachyrhizi*. Os perfis protéicos das plantas foram comparados por eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF). Foram observados 22 *spots* diferencialmente expressos. Destes, foi possível identificar dez proteínas por meio da análise dos espectros de massa. Algumas estão envolvidas em rotas metabólicas relacionadas ao processo de defesa, como é o caso da anidrase carbônica, 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR), frutose bisfosfato aldolase e glutamina sintetase. Os possíveis significados bioquímico-fisiológicos da expressão diferencial dessas proteínas são discutidos à luz da resposta da soja a este patógeno.

Palavras-chave: Ferrugem asiática da soja, proteômica, eletroforese 2-D, espectrometria de massas, MALDI.

1.0. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta da família Fabaceae, sendo considerada a cultura de maior importância econômica no mundo. Sua produção é mais concentrada nos Estados Unidos e no Brasil, devido às condições ambientais favoráveis ao seu cultivo (Embrapa Soja, 2011). É a segunda cultura mais importante dos Estados Unidos contribuindo com 19 bilhões de dólares anuais para a economia daquele país (Panthee et al., 2009). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, sendo a cultura de maior área cultivada no país, tendo ocupado cerca de 23,6 milhões de hectares na safra de 2009/2010, com uma produção de 68,7 milhões de toneladas (Embrapa Soja, 2011).

Entre os principais fatores que limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção de soja, destacam-se as doenças (Juliatti et al., 2005). São listadas mais de 100 doenças que acometem essa cultura (Sinclair & Backman, 1989), das quais cerca de 50 já foram identificadas no Brasil (Silva et al., 2007). As perdas anuais de produção por doenças são estimadas entre 15% e 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas que podem atingir 100% (Embrapa Soja, 2011).

A ferrugem asiática da soja (FAS), incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, constitui-se em um dos principais problemas na cultura da soja (Juliatti et al., 2003). É considerada uma das doenças mais agressivas, representando uma ameaça em função dos prejuízos causados e do aumento de custo de produção para o seu controle (Embrapa Soja, 2011). A partir de 2001, a FAS tornou-se um dos problemas mais relevantes da agricultura brasileira (Yorinori et al., 2005). Apesar de várias doenças causarem perda na produção, a FAS tem se tornado uma das doenças mais importantes em quase todas as regiões produtoras de soja no mundo (Purdue, 2011). Uma das características mais importantes da FAS é o fato de o fungo reduzir o potencial fotossintético da planta devido ao amarelecimento e queda prematura das folhas (Soares et al., 2004; Embrapa soja, 2011). Sob condições favoráveis e dependendo do tempo de infecção, a FAS pode causar perdas de até 80% da produção (Dorrance et al., 2005; Embrapa Soja, 2011).

Ainda não foram identificados germoplasmas com resistência genética suficiente que permita o desenvolvimento de cultivares que dispensem o uso de fungicidas para o controle da doença (Tecnologias, 2008). Até o momento, cinco genes de resistência foram descritos em soja: *Rpp1* (Cheng and Chan, 1968; Hidayat and Somaatmadja, 1977), *Rpp2* (Hidayat and Somaatmadja, 1977), *Rpp3* (Bromfield and Hartwig, 1980), *Rpp4* (Hartwig, 1986) e *Rpp5* (Garcia et al., 2008). A eficiência destes genes é limitada (parcial) devido à virulência e variabilidade do patógeno. As fontes de resistência identificadas são específicas para certas raças do patógeno (Bonde et al., 2006). Ainda não há cultivares comerciais imunes e o mecanismo de controle da doença mais utilizado é o uso de fungicidas, o que aumenta o custo de produção e acarreta problemas ambientais (Miles et al., 2006; Goellner et al., 2010).

O controle das doenças de plantas por meio de resistência genética é a forma mais eficaz e econômica. Para viabilizar o uso dessa estratégia, é importante estudar os genes da soja expressos diferencialmente em resposta a *P. pachyrhizi*, pois isso pode ajudar no entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença, fornecendo ferramentas para programas de melhoramento genético para a criação de cultivares de

soja resistentes à doença (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009). Apesar de estudos moleculares sobre a resposta do hospedeiro ao patógeno estarem sendo realizados, há ainda pouca informação sobre a base molecular dessa interação (Mortel et al., 2007; Pham et al., 2009; Tremblay et al., 2010). Estudos bioquímicos têm sido feitos visando esse mesmo fim (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009; Mortel et al., 2007; Júnior, 2007; Choi et al., 2008; Tremblay et al., 2010; Goellner et al., 2010; Cooper et al., 2011).

Diante deste quadro, há um crescente interesse por métodos alternativos que eliminem ou diminuam o uso dos defensivos químicos. O conhecimento adquirido por meio de estudos bioquímicos do genoma e do proteoma das espécies pode fornecer subsídios na busca de alternativas para o controle de pragas e doenças. O proteoma pode ser definido como o conjunto de todas as proteínas expressas em um tecido, célula ou sistema biológico em dado momento celular, ou como o perfil das proteínas celulares expressas pelo genoma de um organismo sob determinada situação fisiológica. A análise proteômica refere-se à avaliação sistemática do proteoma, de forma a comparar a expressão protéica de células, tecidos ou organismos em distintos momentos fisiológicos, como por exemplo, tecidos doentes e sadios, tratados e não-tratados, resistentes e suscetíveis (Wilkins et al., 1995). As proteínas diferencialmente expressas em situações de estresse biótico permitem identificar os genes envolvidos em suas sínteses, podendo auxiliar programas futuros de manipulação genética na criação de plantas resistentes a patógenos. Utilizando técnicas de separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e de identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/time-of-flight*), o presente trabalho objetivou identificar proteínas diferencialmente expressas em dois genótipos de soja (PI561356 – com resistência parcial e Embrapa 48 – suscetível) em resposta à inoculação com esporos de *P. pachyrhizi*.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e inoculação com esporos de *P. pachyrhizi*

Os genótipos utilizados neste experimento foram disponibilizados pelo Banco Ativo de Germoplasma de Soja (BAG) da Embrapa Soja, Londrina – PR. As plantas foram inoculadas no estágio de desenvolvimento V2 com esporos de um conjunto de isolados do fungo *P. pachyrhizi*, por meio de pulverização com uma suspensão de uredósporos ajustada para uma concentração de 70.250 esporos por litro. As folhas de plantas de dois genótipos distintos (PI561356, com resistência parcial e Embrapa 48,

suscetível) foram coletadas nos tempos de 72 horas após inoculação (h.a.i.) e de 192 h.a.i. Tem sido observado, em alguns trabalhos, que a resposta celular ao patógeno tem sido intensa no tempo de 72 h.a.i. (Mortel et al., 2007, Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009) e também quando o fungo atinge um estágio de produção das uredínias (urediniósporos) (Tremblay et al., 2010). Para cada genótipo e dentro de cada tempo foram coletadas também folhas de plantas do controle não inoculado. Foram analisados oito tratamentos, com três repetições biológicas para cada tratamento.

2.2. Extração de Proteínas

A extração das proteínas das folhas foi feita pelo método do SDS/FENOL, seguida da precipitação com acetato de amônio 0,1M em metanol (Wang et al., 2003), com modificações. As folhas foram maceradas com N₂ líquido em almofariz e pistilo até ser produzido um pó fino. O pó, juntamente com o nitrogênio líquido, foi transferido para tubo do tipo Falcon de 50 mL. Após evaporação do N₂, foram adicionados ao pó 20 mL de tampão de extração (polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1%, β-mercaptoetanol 2%, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM em acetona gelada). Em seguida, o material foi agitado em vórtex, sonicado a 30% da potência máxima do aparelho UltraSonic Processor (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB) e centrifugado a 6000 *g*, a 4 °C, por 15 min. O *pellet* foi lavado (ressuspendido com auxílio de vórtex e centrifugado a 6000 *g*, por 10 min, a 4 °C) sucessivamente em acetona P.A. (duas vezes), ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona (quatro vezes), TCA 10% em água (duas vezes), acetona 80% (duas vezes) e etanol 80% (uma vez), e seco à temperatura ambiente durante a noite.

O *pellet* obtido na etapa anterior foi ressuspendido em 10 mL de tampão de SDS denso (0,75M de sacarose; Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 2%; 0,1M de Tris-HCl, pH 8,0; β-mercaptoetanol 2%; PMSF 1mM) e mantido à temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi transferida para tubo tipo Falcon de 15 mL e acrescida de 5 mL de fenol tamponado (pH 8,0) para a extração das proteínas. A mistura foi mantida em gelo por 10 minutos sendo agitada em vórtex em três ciclos de 30s e então centrifugada a 6000 *g* por 10 min a 4 °C para a separação da fase fenólica contendo as proteínas. A fase fenólica foi transferida para novo tubo tipo Falcon de 50 mL ao qual foram adicionados 20 mL de acetato de amônio 0,1M em metanol para a precipitação das proteínas. Após 30 min a -20 °C, o tubo foi centrifugado a 6000 *g* por 15 minutos, a 4 °C. O *pellet* obtido foi lavado (ressuspendido com auxílio de vórtex e centrifugado a 6000 *g* por 10 min a 4 °C) sequencialmente em acetato de amônio 0,1M em metanol (duas vezes), acetona 80%

(duas vezes) e etanol 70% (uma vez). O *pellet* final foi seco à temperatura ambiente durante a noite, ressuspendido em tampão de amostra (uréia 7M, tiouréia 2M e CHAPS 4%) e sonificado a 10% da potência máxima do aparelho UltraSonic Processor (Modelo GE 50). A quantificação de proteínas totais foi feita pelo Método de Bradford (1976) e o extrato protéico foi armazenado a -80 °C até o momento da eletroforese bidimensional.

2.3. Separação de proteínas totais por Eletroforese Bidimensional (2D-SDS-PAGE)

2.3.1. Reidratação das tiras de gel da primeira dimensão

Para a primeira dimensão (separação por ponto isoeletrico), foram utilizadas tiras de gel de 24cm (com um gradiente linear de pH de 3,0 a 10,0). A reidratação foi realizada em aparato de reidratação IPG BOX (GE Healthcare) em um período de 12h a 20h. Para reidratar cada tira, foi utilizada uma mistura (450µL) contendo solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%(m/v), azul de bromofenol 0,002%(m/v), ditioneitol (DTT) 0,2%(m/v) e tampão IPG 2,5%) e tampão de amostra contendo 1 mg de proteínas (Handbooks-GE Healthcare, 2004).

2.3.2. Focalização Isoeletrica (IEF)

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare). A corrida eletroforética para a primeira dimensão foi feita segundo o Handbooks (GE Healthcare, 2004), de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V por 18h; 2) 500 V em passo único por 1 h; 3) 800 Vh em gradiente até 1000 V; 4) 16500 Vh em gradiente até 10000 V; 5) 27000 Vh em passo único de 10000 V. Após a IEF, as tiras foram armazenadas a -80 °C até o momento da segunda etapa da eletroforese bidimensional.

2.3.3. Equilíbrio das Tiras de gel

Após a IEF, as tiras foram equilibradas em 10 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl 75mM pH 8,8, uréia 6M, glicerol 29,3% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v)). Foram realizadas duas etapas de equilíbrio de 30 min cada, com a finalidade de reduzir e alquilar as proteínas. Na primeira, foram adicionados 180 mg de DTT a 10 mL do tampão de equilíbrio, e na segunda, 430 mg de iodoacetamida a outros 10 mL do mesmo tampão (Handbooks-GE Healthcare, 2004). Após os dois passos de equilíbrio, as tiras foram submersas por alguns segundos em tampão de corrida 1x (Laemmli, 1970) e imediatamente submetidas à segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

2.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A segunda dimensão da eletroforese das proteínas presentes nas tiras IPG foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação por massa molecular na concentração de 12,5% de poliacrilamida (Acrilamida 30%, N,N'-metilbisacrilamida 2,6%), em cuba DaltSix (GE Healthcare). A corrida foi processada a 10 mA/gel por 45 min e em seguida a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 8 °C por meio de refrigeração com circulador termostático.

2.3.5. Análise da expressão de proteínas

As proteínas presentes nos géis bidimensionais foram evidenciadas pela coloração com coomassie blue G-250 (Handbooks-GE Healthcare, 2004). Os géis foram fotodigitalizados em aparelho Image Scanner III (GE-Healthcare) e as imagens foram calibradas com o software *Labscan* (GE-Healthcare). As análises comparativas das imagens foram efetuadas utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 7.5 (GE-Healthcare). A comparação foi feita entre o controle não inoculado e o inoculado para cada genótipo e para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Nas análises, foram considerados diferencialmente expressos, *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (*Ratio*) acima de 1,5 e ANOVA com $p < 0,05$. Dentro de cada tratamento e para cada um dos *spots* diferencialmente expressos, foi calculado o valor médio da porcentagem de volume (%Vol) para o inoculado e para o não inoculado. A comparação destes valores indica a diferença de expressão destas proteínas entre o inoculado e seu controle não inoculado, no seu determinado tempo e genótipo.

2.4. Tripsinização de proteínas em gel

Os *spots* correspondentes a proteínas diferencialmente expressas foram retirados e submetidos à tripsinólise em gel segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2006), com algumas modificações. Os pedaços de gel foram transferidos para tubos de PCR (200µL) siliconizados e previamente lavados em dois banhos de metanol. A descoloração das proteínas no gel foi feita em solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25mM, pH 8,0 por duas lavagens de 1 h cada, uma lavagem durante a noite e outra de 1 h no dia seguinte, todas elas incubadas à temperatura ambiente a 750 rpm no

aparelho *Thermomixer digital Comfort (Eppendorf)*. A seguir, a solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila pura por duas vezes de 5 min e secos em *Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf)* por 15 min. As proteínas foram, então, reduzidas com DTT a 65mM em bicarbonato de amônio a 100mM, pH 8,0, por 30 min, a 56 °C, em thermomixer, a 500 rpm. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 200mM em bicarbonato de amônio a 100mM, pH 8,0, por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, e incubadas em thermomixer a 500 rpm. Sequencialmente, os pedaços de gel foram, por duas vezes, lavados em bicarbonato de amônio a 100mM (pH 8,0) por 10 min, desidratados em acetonitrila pura por 5 min e após uma etapa adicional de desidratação, secos em *Speed Vac* por 15 min. A digestão triptica foi realizada utilizando a *Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280*. A enzima (100µg) foi ressuspensa em 100µL de ácido acético 50mM (J.T. Backer). A solução de clivagem foi feita a partir da solução estoque da tripsina (1000 ng/µL) acrescentando um volume da solução de bicarbonato de amônio 40mM/acetonitrila 10% pH 8,0, de modo que a concentração final da enzima ficasse a 25 ng/µL. Em cada tubo, foram aplicados 20µL de solução de clivagem de forma a cobrir os pedaços de gel. Os tubos foram mantidos em gelo por 45 min para que a enzima pudesse penetrar no gel sem que se iniciasse a digestão. Após este período, 50µL da solução de bicarbonato de amônio 40mM/acetonitrila 10%, pH 8,0, foram adicionados a cada tubo. As amostras foram, então, incubadas a 37 °C por 16h (durante a noite) no thermomixer a 500 rpm. Após a digestão, os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, vórtex por 20 s e toda a solução do tubo foi removida para um novo tubo. A cada pedaço de gel restante, em duas etapas sequenciais, foram adicionados 30µL da solução de ácido fórmico 5%/acetonitrila 50%, sendo submetidos a vórtex por 20 s e incubados 15 min em repouso a temperatura ambiente, 2 min no banho ultrassom e mais 20 s no vórtex. Toda a solução foi removida e adicionada à solução do tubo novo. As amostras, contendo peptídeos tripticos, foram concentradas até cerca de 10µL em *SpeedVac*. Os peptídeos foram posteriormente dessalinizados em coluna de hidrofobicidade C18 (Zip Tip) da marca Millipore.

2.5. Espectrometria de Massas e Identificação das Proteínas

A obtenção de espectros de massas dos peptídeos resultantes foi feita no espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF/TOF (*Ultraflex III, Bruker Daltonics*) disponibilizado pelo Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV. As amostras de peptídeos tripticos foram aplicadas numa proporção 1:1 com a matriz ácido

α -Ciano-4-hidroxicinâmico. As listas de massas dos espectros obtidos foram analisadas para a identificação das proteínas pelo método “*peptide mass fingerprinting*” (PMF) e por “MS-MS ion search” (PFF-*Peptide Fragment Fingerprinting*) utilizando o software MASCOT DAEMON disponibilizado também pelo NuBioMol. Nestes processos, foram utilizados os bancos de dados do NCBI, Swissprot e da *Glycine max* (Phytzome), com três valores de tolerância para a variação de massas (0,05Da, 0,1Da e 0,5Da). Alguns parâmetros de modificações pós-traducionais também foram estabelecidos como a carbamidometilação dos resíduos de cisteína como modificação fixa (alquilação com iodoacetamida) e oxidação da metionina como variável.

3.0. RESULTADOS

O primeiro tempo analisado foi o de 192 h.a.i., fase na qual o fungo produz os urediniósporos (Mortel et al., 2007; Tremblay et al., 2010). Neste tempo, a análise dos géis do genótipo PI561356 permitiu a observação de 1.449 *spots* bem resolvidos, com um número de *matches* igual a 790 sendo detectados quatro *spots* diferencialmente expressos, porém não identificados. A análise dos géis do genótipo Embrapa 48 permitiu a observação de 1.367 *spots* bem resolvidos com um número de *matches* igual a 779 sendo detectados cinco *spots* diferencialmente expressos dos quais três foram identificados. Estes *spots* identificados representam três proteínas mais expressas no inoculado: subunidade A da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Cloroplasto), 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR) e anidrase carbônica. Na Figura 1 estão indicados os *spots* correspondentes a estas proteínas.

O segundo tempo analisado foi o de 72 h.a.i. Neste tempo, a análise dos géis do genótipo Embrapa 48 permitiu a observação de 716 *spots* bem resolvidos, com um número de *matches* igual a 580 não sendo detectados *spots* diferencialmente expressos. A análise dos géis do genótipo PI561356 permitiu a observação de 711 *spots* bem resolvidos, com um número de *matches* igual a 552 sendo detectados 13 *spots* diferencialmente expressos dos quais nove foram identificados. Estes *spots* identificados corresponderam a sete diferentes proteínas: proteína tumoral controlada traducionalmente, gama glutamil hidrolase, proteína ribossomal 30S de cloroplasto, fator de alongação 1-alfa, proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco (menos expressas no inoculado), glutamina sintetase e frutose bisfosfato aldolase (mais expressas no inoculado). A Figura 2 mostra os *spots* referentes às proteínas identificadas e diferencialmente expressas no genótipo PI561356 72 h.a.i.

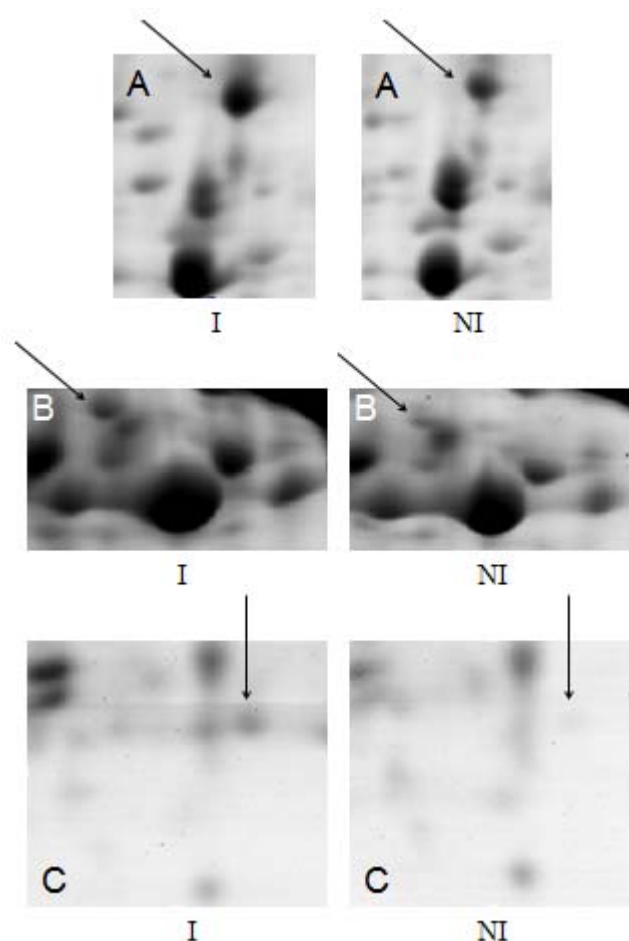


Figura 1- Spots correspondentes a proteínas diferencialmente expressas no genótipo Embrapa 48 (suscetível) 192 horas após inoculação (h.a.i.). I = inoculado; NI = não inoculado. A) Subunidade A da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; B) 1-desoxi-D-xilulose -5-fosfato-redutoisomerase (DXR); C) Anidrase carbônica.

A subunidade A da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Cloroplasto) apresentou um valor médio de %Vol para o inoculado igual a 0,332% e para o não inoculado igual a 0,155% sendo, portanto, 2,14 vezes mais expressa por efeito da inoculação (Figura 3).

A enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR) foi 2,5 vezes mais expressa no inoculado como observado na Figura 3.

A enzima anidrase carbônica foi mais expressa no genótipo suscetível inoculado sendo identificada como ausente no não inoculado (192 h.a.i.) pelo software ImageMaster (Figura 1).

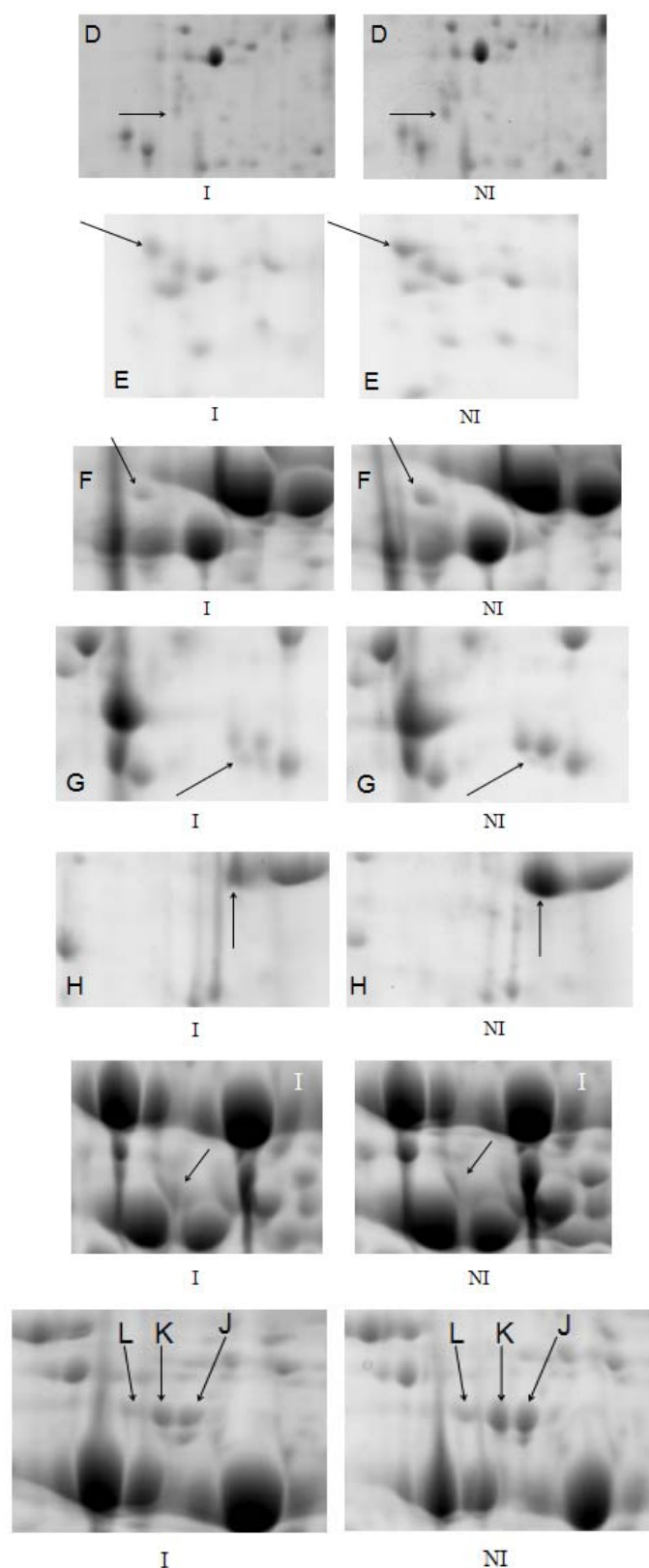


Figura 2 - *Spots* correspondentes a proteínas diferencialmente expressas no genótipo PI561356 (com resistência parcial) 72 horas após inoculação (h.a.i.). I= inoculado; NI = não inoculado. D) Proteína tumoral controlada traducionalmente; E) Gama glutamil hidrolase; F) Proteína ribossomal 30S de cloroplasto; G) Frutose bisfosfato aldolase; H) Fator de elongação 1-alfa; I) Glutamina sintetase; J, K e L) Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco.

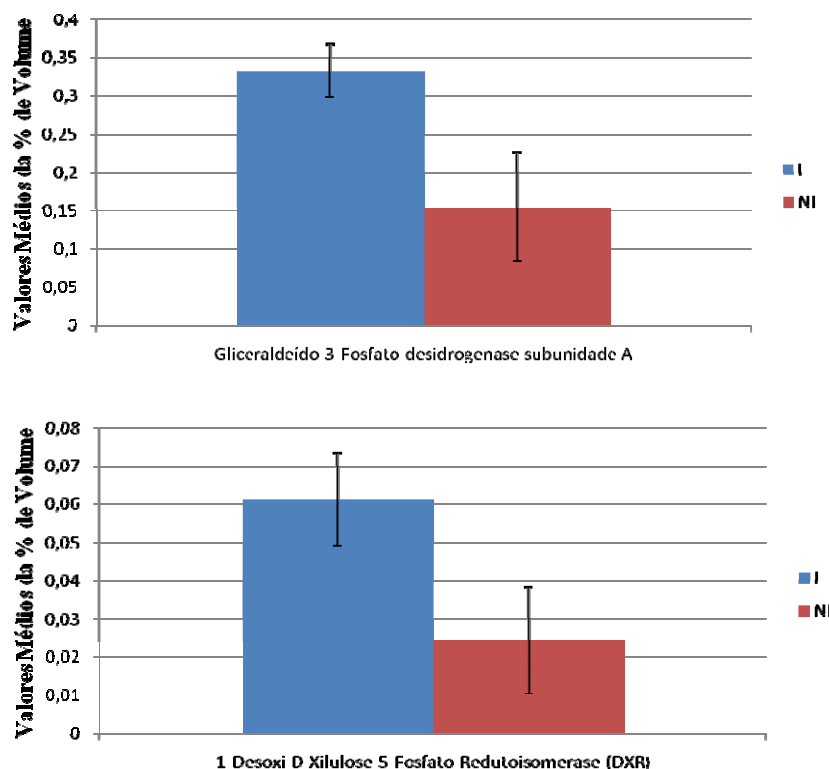


Figura 3- Diferença de expressão das proteínas subunidade A da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Cloroplasto) e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR) com base na comparação entre valores médios da %Vol de *spots* do inoculado e do não-inoculado para o genótipo Embrapa 48, 192 h.a.i. I = inoculado; NI = não inoculado.

A anidrase carbônica é uma enzima que exerce funções importantes no cloroplasto e não deve estar ausente nas células do não inoculado, mas uma das limitações da técnica da eletroforese 2D é que proteínas de baixa concentração podem não ser detectadas. Na análise de imagem no software ImageMaster, estabelecemos parâmetros mínimos de identificação de *spots*, como saliência, *smooth* e área mínima e se o *spot* está aquém destes parâmetros, ele não é detectado. Mas, o importante é que fica evidente a maior expressão da anidrase carbônica nas plantas inoculadas.

A Figura 4 mostra a diferença de expressão de proteínas 72 h.a.i. no genótipo resistente. Pela análise dos gráficos observa-se que houve proteínas menos expressas por efeito da inoculação e uma que foi mais expressa. Na Tabela 1 estão os valores das diferenças de expressão de cada proteína identificada, de ambos os tempos analisados, com base na comparação dos valores médios de %Vol dos *spots* entre plantas inoculadas e não inoculadas. O *Spot* correspondente à proteína frutose bisfosfato aldolase foi detectado apenas nos géis do inoculado (Figura 2) e a ela aplica-se a mesma interpretação dada para a anidrase carbônica.

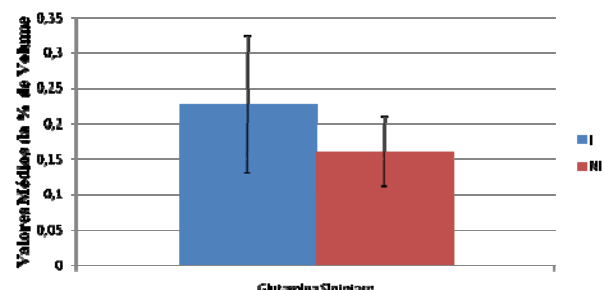
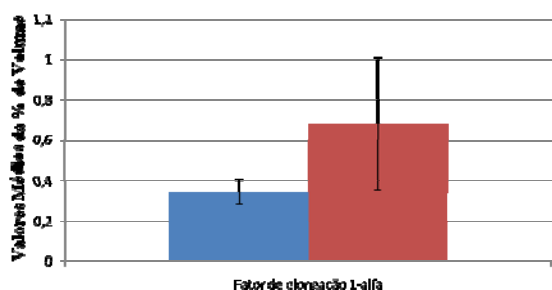
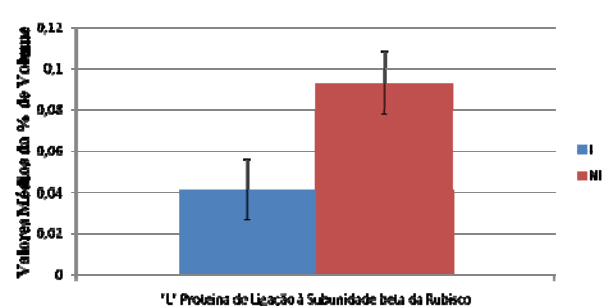
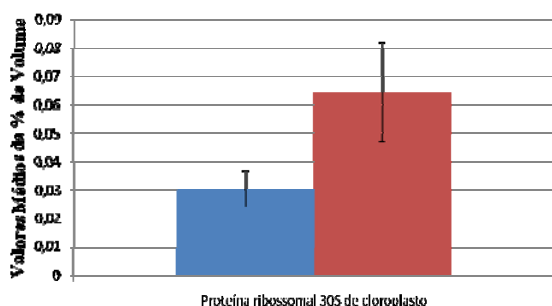
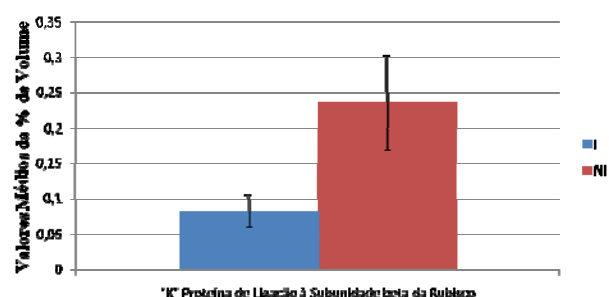
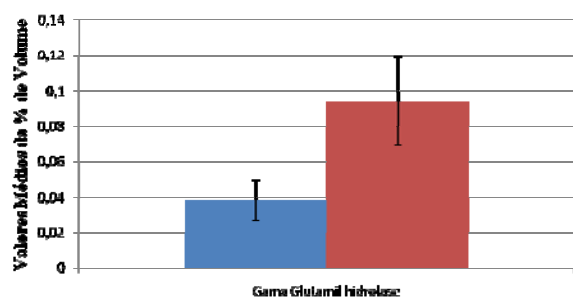
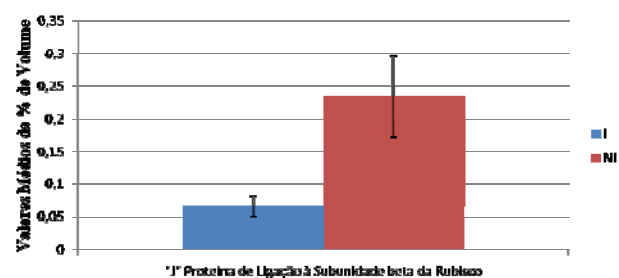
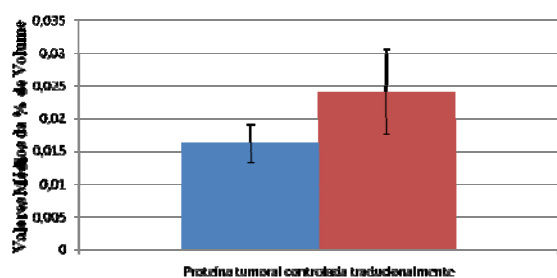


Figura 4- Diferença de expressão de proteínas no genótipo PI561356 com base na comparação entre valores médios da %Vol de *spots* correspondentes a cada proteína para o inoculado e para o não-inoculado 72 h.a.i. I = inoculado; NI = não inoculado.

Tabela 1 - Proteínas diferencialmente expressas no genótipo Suscetível 192 h.a.i. e no genótipo resistente 72 h.a.i. e seus respectivos valores de diferença de expressão entre o inoculado e não inoculado. O sinal (+) indica o aumento de expressão em resposta ao *P. pachyrhizi*. O sinal (-) indica diminuição da expressão.

Nome da Proteína	Diferença de Expressão	
Subunidade A da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Cloroplasto)	+2,14x	Embrapa 48 192 h.a.i.
1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR)	+2,5x	
Proteína tumoral controlada traducionalmente	-1,49x	PI561356 72 h.a.i.
Gama glutamil hidrolase	-2,46x	
Proteína ribossomal 30S de cloroplasto	-2,13x	
Fator de alongação 1-alfa	-1,97x	
Glutamina sintetase	+1,41 x	
J – Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco	-3,58x	
K – Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco	-2,86x	
L – Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco	-2,25x	

A Tabela 2 mostra dados de identificação das dez proteínas cujos peptídeos triptícos foram analisados em espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF para a obtenção das listas de suas massas. Estes dados foram úteis para identificar cada uma delas por meio do software MASCOT DAEMON que confronta massas obtidas experimentalmente com as teóricas existentes em bancos de dados públicos, tanto para a lista de massas de espectros resultantes de peptídeos triptícos (PMF) como para a lista de massas de espectros resultantes da fragmentação de cada um destes peptídeos triptícos. Para cada proteína, foi determinado o valor de *score* encontrado pela análise do PMF e o número de peptídeos que foram fragmentados para confirmar a identificação destas proteínas pelo PFF. Todos os espectros obtidos da fragmentação que foram utilizados para estas confirmações apresentaram valores de *score* significativos (dados não mostrados). Na Tabela 2 estão também o número de acesso da proteína e o banco de dados onde ela foi localizada.

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas em folhas de soja em resposta a *P. pachyrhizi* nos genótipos Embrapa 48 (Spot ID A-C) e PI561356 (Spot ID D-L).

Spot ID	Nome da Proteína (espécie)	Dados do Mascot		Número de acesso/Banco de Dados	Sequência coverage	Experimental		Teórico	
		PMF/Protein Score/Banco de Dados	PFF (número de Fragmentações)			MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI
A	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase subunidade A (Cloroplasto). (<i>Glycine max</i>)	78/NCBIInr	3	gi 77540210/NCBIInr	28%	45,628	6,7	43,479	8,42
B	1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutase (DXR) (<i>Pueraria Montana</i> var. lobata)	145/NCBIInr	4	gi 35187000/NCBIInr	22%	49,157	5,69	50,809	5,83
C	Anidrase carbônica (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	114/ <i>Glycine max</i>	3	gi 270342124/NCBIInr	67%	27,413	6,9	23,455	7,36
D	Proteína tumoral controlada traducionalmente	85/NCBIInr	4	gi 20140683	55%	21,560	4,19	19,098	4,57
E	Gama glutamyl hidrolase (<i>Glycine Max</i>)	90/SwissProt	5	P93164.1/SwissProt	35%	35,597	9,15	37,824	6,08
F	Proteína ribossomal 30S de cloroplasto	109/ <i>Glycine max</i>	7	P29344.1/SwissProt	31%	44,510	4,76	45,222	5,14
G	Frutose bisfosfato aldolase	91/ <i>Glycine max</i>	4	O65735.1/SwissProt	27%	39,423	7,7	32,945	6,73
H	Fator de elongação 1-alfa (<i>Ricinus communis</i>)	76/NCBIInr	4	gi 223532558/NCBIInr	29%	54,275	9,7	49,746	9,15
I	Glutamina sintetase (<i>Glycine Max</i>)	90/ <i>Glycine max</i>	3	gi 13877511/NCBIInr	30%	47,703	5,18	47,946	7,63
J	Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco (<i>Ricinus communis</i>)	113/NCBIInr	12	gi 157337766/NCBIInr	31%	62,228	5,26	64,583	5,80
K	Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco	94/NCBIInr	12	gi 2506277/NCBIInr	26%	62,168	5,19	63,287	5,85
L	Proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco	77/NCBIInr	12	gi 2506277/NCBIInr	24%	62,929	5,11	63,287	5,85

4.0. DISCUSSÃO

A identificação de proteínas diferencialmente expressas nos dois tempos analisados após a infecção da soja com *P. pachyrhizi* permite a discussão das suas possíveis funções na interação patógeno-hospedeiro. A anidrase carbônica é uma metaloenzima contendo zinco em sua estrutura que catalisa a interconversão $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ em plantas. Ela catalisa a conversão de HCO_3^- em CO_2 para a fixação do carbono pela Rubisco; a conversão de CO_2 em HCO_3^- para fixação do carbono pela PEPcarboxilase em plantas C_4 , promovendo o rápido equilíbrio entre estes compostos e facilitando a difusão do CO_2 . Para as plantas C_3 , como a soja, a anidrase carbônica facilita a difusão do carbono pelo citosol e estroma mantendo-o na forma de HCO_3^- , convertendo-o a CO_2 para a Rubisco no momento da fixação do carbono pelo ciclo de Calvin (Badger and Price, 1994).

Há evidências de que esta enzima, que tem papéis importantes na fotossíntese, está envolvida com mecanismos moleculares de defesa de plantas contra patógenos. Em plantas, o ácido salicílico (AS) exerce um importante papel nas respostas de defesa local

e sistêmica (Slaymaker et al., 2002). Ele é sintetizado por plantas em resposta a patógenos biotróficos (Loake and Grant, 2007). Para elucidar os mecanismos pelos quais este composto induz respostas de defesa, algumas proteínas potencialmente efetoras do AS foram identificadas (Slaymaker et al., 2002). Em folhas de tabaco, Slaymaker et al. (2002) relataram a presença de mais uma proteína de ligação a AS (SABP3) somando-se a duas previamente encontradas (SABP e SABP2). Foi observado que a fração solúvel do cloroplasto de tabaco tem afinidade por AS. Para identificar a SABP3, esta fração foi purificada por cromatografia e a fração correspondente a SABP3 apresentou um aumento de 600 vezes na atividade de ligação ao AS. Dados de espectrometria de massas e sequenciamento revelaram que esta fração protéica corresponde à anidrase carbônica do cloroplasto. Em um ensaio enzimático que envolveu todas as frações resultantes das etapas de cromatografia, a que apresentou afinidade pelo AS foi a mesma que apresentou ter a atividade da anidrase carbônica. Restrepo et al. (2005) analisaram a variação na expressão gênica de *Solanum tuberosum* em sua interação compatível com o fungo *Phytophthora infestans*. Neste trabalho, os autores observaram um decréscimo na expressão da anidrase carbônica ao longo do tempo de inoculação. Os autores promoveram o silenciamento do gene que codifica esta enzima em *Nicotiana benthamiana* e demonstraram que nas plantas silenciadas o patógeno se desenvolveu mais rapidamente, indicando que a supressão desta enzima do cloroplasto aumenta a suscetibilidade ao *P. infestans*. Panthee et al. (2007) encontraram transcritos correspondentes a proteínas relacionadas ao AS super expressas no cultivar 5601T no estágio V2 em resposta a *P. pachyrhizi*. Estes resultados, somados aos encontrados no presente trabalho, indicam uma possível função da anidrase carbônica nos mecanismos metabólicos envolvidos em defesa de plantas.

A enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR) de cloroplasto é uma das primeiras da via metabólica MEP (2C-metil-D-eritritol 4-fosfato) que é o precursor do isopentenil difosfato (IPP) e do seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), os quais são os precursores na síntese de isoprenóides (Hasunuma et al., 2008; Estévez et al., 2001). Os isoprenóides desempenham importantes funções em muitos aspectos do metabolismo celular, incluindo a fotossíntese (carotenóides e clorofilas), respiração (ubiquinona), regulação do desenvolvimento (ácido giberélico e ácido abscísico) e defesa contra ataque de patógenos (Wanke et al., 2001). Hasunuma et al. (2008) citam vários trabalhos que permitem concluir que a enzima DXR é um ponto-chave na via metabólica MEP e correlacionam o aumento da expressão gênica de DXR com o aumento na produção de isoprenóides. Esses autores demonstram que a super

expressão do gene da DXR em cloroplastos contribui ainda mais para o aumento na síntese de isoprenóides. Zhi-lin et al. (2007) citam a via metabólica MEP como uma das que são induzidas por fungos endofíticos.

Há dois mecanismos de defesa em plantas contra o ataque de patógenos: a resposta hipersensitiva (RH) e a resistência adquirida sistêmica (RAS). A RH é caracterizada pela morte celular ao redor do sítio de infecção. Como resultado, o patógeno permanece confinado próximo das lesões necróticas e o anel de células ao redor destas lesões impedem a propagação da infecção, sendo o processo conhecido como resistência adquirida local (RAL). Esta resposta local frequentemente desencadeia o segundo mecanismo de defesa, a RAS. Uma das alterações metabólicas que acontecem na RAL é a estimulação das vias de metabolismo secundário, algumas das quais produzem pequenas moléculas com atividade antibiótica, como as fitoalexinas (Odjakova and Hadjiivanova, 2001). As fitoalexinas são um grupo específico de isoprenóides conhecidos como diterpenos que são terpenóides (ou isoprenóides), apresentando 20 átomos de carbono em sua estrutura molecular (Iriti and Faoro, 2009). No presente trabalho, foi verificado um aumento na expressão de DXR no genótipo Embrapa 48 192 h.a.i. À luz da literatura, verifica-se que esta enzima é uma das principais controladoras da via metabólica MEP que tem os isoprenóides como uma classe de produtos finais e que apresenta alguns tipos envolvidos no mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos: as fitoalexinas.

O genótipo Embrapa 48 também apresentou um nível de expressão mais elevado da subunidade A da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDHa) em plantas inoculadas 192 h.a.i. No cloroplasto, esta enzima participa da via de fixação do carbono para a síntese de glicose. Laxalt et al. (1996), por meio de análises por Northern blot, evidenciaram um aumento no acúmulo de transcritos para a subunidade C da GAPDH citosólica (GAPDHc) em folhas e caules de *Solanum tuberosum* L. quando inoculadas com *P. infestans*. Quando células do caule foram submetidas ao ácido eicosapentanoico, um elicitor encontrado em *P. infestans*, os níveis de transcritos para a GAPDHc também aumentaram e paralelamente houve indução do gene que codifica a enzima hidróximetil glutaril coenzima A redutase (HMGR), que participa da síntese de isoprenóides (fitoalexinas). Neste mesmo trabalho os autores submeteram tecidos foliares ao ácido salicílico e constataram também um acúmulo de transcritos para a GAPDHc.

Durante a interação de plantas com patógenos, a RAS é induzida como parte da reação de defesa da planta como um todo, ocorrendo um aumento nos níveis dos

intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2) (Chen et al. 1993). Zaffagnini et al. (2007), examinando modificações redox em A₄GAPDH, observaram que a atividade desta enzima foi inibida por oxidantes como H_2O_2 . Diante desta observação, é plausível especular que o aumento na síntese de GAPDH_a seja uma resposta compensatória da sua atividade reduzida pelo acúmulo de H_2O_2 como parte da RAS. Por eletroforese 2D associada à espectrometria de massas, GAPDH_a também foi encontrada super expressa em uma linhagem resistente de arroz (LSBR-5) 24 h.a.i. com *Rhizoctonia solani* (Lee et al., 2006).

Hill et al. (1999) analisaram genes de *Gossypium hirsutum* expressos em resposta à infecção com *Verticillium dahliae*. Nesta interação, os níveis de mRNA da proteína tumoral controlada traducionalmente foram menores em plantas inoculadas em relação às plantas controle não inoculadas ao longo dos tempos de infecção. Em arroz, Zhao et al. (2008) identificaram níveis aumentados de mRNA da mesma proteína 12 h.a.i. com *Rhizoctonia solani*. A proteína tumoral controlada traducionalmente recebeu esta denominação por Gross et al. (1989) com base no fato de que seu cDNA foi clonado de tumor humano e na observação de que esta proteína também é regulada em nível traducional. É altamente conservada e expressa em todos os organismos eucarióticos. Os níveis de expressão desta proteína são altamente regulados em resposta a uma ampla variedade de sinais extracelulares e condições celulares (Bommer and Thiele, 2004). A proteína tumoral controlada traducionalmente é expressa em tecidos mitoticamente ativos, apresentando expressão reduzida em tecidos que não apresentam divisão celular (Thiele et al., 2000). Segundo Li et al. (2001), esta proteína exerce também funções anti-apoptóticas. Estudos mencionam que ela é capaz de se ligar à tubulina e também ao cálcio (MacDonald et al., 1995; Arcuri et al., 2005; Cans et al., 2003). Segundo Zhao et al. (2008), o papel desta proteína em resposta à infecção por patógenos é ainda desconhecido. Em nossas análises, encontramos uma expressão reduzida desta proteína no genótipo PI561356 72 h.a.i.

Muitos estudos das interações biotróficas entre fungo e planta hospedeira mostram que a atividade traducional e a biogênese ribossomal são reduzidas nos estádios iniciais da infecção (Mould and Heath, 1999; Heath, 1997; Manners and Scott, 1983; Manners and Scott, 1985; Tani and Yamamoto, 1978). Yamamoto et al. (1976) demonstraram que a redução na síntese de proteínas, de fato, ocorre especificamente nos estádios iniciais de infecção até três dias após infecção (72 h.a.i.). Confirmando estas observações, neste trabalho foi constatada uma redução nos níveis da proteína

ribossomal 30S de cloroplasto e do fator de alongação 1-alfa no genótipo PI561356 72 h.a.i.

Segundo Tremblay et al. (2010), o metabolismo das pentoses fosfato é uma das principais vias para a produção de compostos fenólicos que são responsáveis pela ativação de mecanismos de defesa. No presente trabalho, no genótipo PI561356, que apresenta resistência parcial, foi identificada a frutose bisfosfato aldolase, uma proteína pertencente a esta via e que se apresentou mais expressa em plantas inoculadas. Tremblay et al. (2010) encontraram transcritos correspondentes a proteínas desta rota metabólica menos expressos em cultivares de soja inoculados (cultivar Williams 82, 10 dias após inoculação) com *P. pachyrhizi*, dentre eles, o da frutose bisfosfato aldolase. Eles afirmam que este resultado está em concordância com o fato da planta suscetível (Williams 82) não conseguir construir um mecanismo de defesa eficiente.

Uma redução na expressão do transcrito correspondente à subunidade menor da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (Rubisco), no cultivar Williams 82, 10 dias após infecção, foi observado por Tremblay et al. (2010). Panthee et al. (2007) também constataram uma redução deste mesmo transcrito 72 h.a.i. no genótipo 5601T. O presente trabalho mostra a expressão reduzida de uma proteína de ligação à subunidade beta da Rubisco no genótipo PI561356 72 h.a.i. Segundo Ellis and Van Der Vies (1988), o cloroplasto contém proteínas solúveis que se ligam não covalentemente às subunidades pequena e grande da Rubisco durante suas sínteses. Estes autores também discutem algumas observações relacionadas com a idéia de que estas proteínas de ligação são um exemplo de uma classe geral de proteínas denominadas de “chaperonas moleculares” as quais são requeridas para a montagem correta de certas proteínas oligoméricas tais como a Rubisco e suas subunidades. Durante a infecção, muitas mudanças podem ocorrer em tecidos de plantas hospedeiras. Uma delas consiste no decréscimo da taxa de fotossíntese (Tremblay et al., 2010).

A disponibilidade de nitrogênio tem um impacto significativo no desenvolvimento de doenças em plantas e a enzima glutamina sintetase (GS) é uma das que participam do metabolismo do nitrogênio em células vegetais (Pageau et al., 2006). A baixa disponibilidade de nitrogênio freqüentemente aumenta a suscetibilidade de plantas a doenças (Solomon et al., 2003). Além disso, alguns estudos têm mostrado que a limitação de nitrogênio pode induzir genes de bactérias e fungos patogênicos (Talbot et al., 1997). Pageau et al. (2006) observaram alterações no nível de transcrito correspondente à GS citosólica (GS1) em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) inoculadas com patógenos virais e bacterianos. Nas condições de infecção, foi

constatado um aumento da expressão de transcritos para a GS1 nos tecidos foliares. Um aumento na expressão destes transcritos também foi observado quando tecidos foliares de tabaco foram submetidos a espécies reativas do oxigênio (H_2O_2), que acumulam nas células durante a RAS. No presente trabalho foi detectado um aumento na expressão da GS no genótipo PI561356 72 h.a.i. Em contraste a esta observação, Tremblay et al. (2010) verificaram uma redução na expressão de transcritos correspondentes a esta proteína em um genótipo suscetível (Williams 82) 10 dias após inoculação.

Utilizando eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas, Krishnan et al. (2011) identificaram a gama glutamil hidrolase como parte integrante da seiva do xilema em *Glycine max*. Trabalhos prévios indicam que a composição de proteínas do xilema pode ser alterada significativamente por infecção de patógenos e estas proteínas podem ser detectadas em pontos distantes do sítio de infecção (Rep et al., 2002). Proteínas relacionadas à patogenicidade como peroxidases, quitinases e serino-proteases foram encontradas em grande quantidade na seiva do xilema em várias espécies de plantas (Buhtz et al. 2004). Um estudo proteômico foi conduzido por Subramanian et al. (2009) para identificar mudanças de expressão protéica na seiva do xilema de soja em resposta às interações simbióticas (*Bradyrhizobium japonicum*) e patogênicas (*Phytophthora sojae*). Como resultado da interação patogênica, os autores constataram que houve um aumento na síntese de várias proteínas na seiva do xilema e que este aumento inibiu o desenvolvimento do fungo. Rep et al. (2002) observaram alterações na expressão protéica da seiva do xilema em tomate (*Lycopersicon esculentum*) quando plantas infectadas com o fungo *Fusarium oxysporum* foram analisadas. Diante disto, há algumas evidências de que a alteração da expressão da gama glutamil hidrolase que, em nossas análises, foi menos expressa no genótipo PI561356 72 h.a.i. possa estar relacionada com uma das respostas da soja a *P. pachyrhizi*.

5.0. CONCLUSÕES

As proteínas diferencialmente expressas nos genótipos PI561356 e Embrapa 48, em resposta à inoculação com *P. pachyrhizi*, estão potencialmente envolvidas com a resposta do hospedeiro ao patógeno. Algumas estão envolvidas em rotas metabólicas relacionadas ao processo de defesa, como é o caso da anidrase carbônica, DXR, frutose bisfosfato aldolase e glutamina sintetase. A super expressão de GAPDHα é uma evidência de um acúmulo de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2) pela RAS, uma vez que a atividade desta enzima é inibida por este acúmulo. Apesar do papel da proteína tumoral controlada traducionalmente, em resposta a infecção por patógenos, ser

ainda desconhecido, foram observadas, em outros trabalhos, alterações na expressão desta proteína em resposta a diferentes condições fisiológicas da célula. Neste trabalho, foi detectada uma expressão reduzida desta proteína no genótipo PI561356 72 h.a.i. A expressão de proteínas da seiva do xilema pode ser alterada como foi o caso da gama glutamil hidrolase que foi menos expressa no genótipo PI561356 72 h.a.i. Resultados paralelos aos nossos mostram que alterações na expressão destas proteínas inibem o desenvolvimento de patógenos em plantas. As demais proteínas confirmam observações prévias de que a fotossíntese e a síntese global de proteínas tendem a diminuir em plantas por ataque de patógenos.

Estes achados fornecem informações que ajudam a compreender como a soja responde à infecção por *P. pachyrhizi*. Nossos resultados vêm se somar àqueles já relatados na literatura e representam uma grande contribuição para o entendimento dos mecanismos moleculares da interação hospedeiro- patógeno. Esse entendimento não só é importante sob o ponto de vista fitopatológico e fisiológico, mas também abre possibilidades concretas para o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes à FAS. Salienta-se que há necessidade de mais estudos em outros tempos de inoculação e com plantas inoculadas em outros estádios de desenvolvimento, tanto nos genótipos já avaliados como em outros genótipos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos do Genosoja (Consórcio Nacional para Estudos do Genoma da Soja.)/CNPq, Finep e Fapemig.

Referências Bibliográficas

- Arcuri, F.; Papa, S.; Meini, A.; Carducci, A.; Romagnoli, R.; Bianchi, L.; Riparbelli, M.G.; Sanchez, J.C.; Palmi, M.; Tosi, P.; Cintonino, M. The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, 73:745–751, 2005.
- Bonde, M. R.; Nester, S.E.; Austin, C.N.; Stone, C.L.; Frederick, R.D.; Hartman, G.L.; Miles, M.R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, 90:708–716, 2006.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248–254, 1976.

- Badger, M.R. and Price, G.D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 45:369-392, 1994.
- Brommer, U.A. and Thiele, B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36:379-385, 2004.
- Bromfield, K. R., and Hartwig, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, 20:254-255, 1980.
- Buhtz, A.; Kolasa, A.; Arlt, K.; Walz, C.; Kehr, J. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. **Planta**, 219:610–618, 2004.
- Cans, C.; Passer, B.J.; Shalak, V.; Nancy-Portebois, V.; Crible, V.; Amzallag, N.; Allanic, D.; TuWno, R.; Argentini, M.; Moras, D.; Fiucci, G.; Goud, B.; Mirande, M.; Amson, R.; Telerman, A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 100:13892–13897, 2003.
- Chen, Z.; Silva, H.; Klessig, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, 262:1883–1886, 1993.
- Cheng, Y. W., and Chan, K. L. The breeding of ‘Tainung 3’ soybean. **J. Taiwan Agricultural Research**, 17:30-35, 1968.
- Choi, J.; Alkharouf, N.; Schneider, K.; Matthews, B.; Frederick, R. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipooxygenases. **Functional & Integrative Genomics**, 8:314–359, 2008.
- Cooper, B.; Campbell, K.B.; Feng, J.; Garrett, W.M. and Frederick, R. Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. **Molecular BioSystems**, 7:773–783, 2011.
- Dorrance, A.E.; Draper, M.A.; Rshman, D.E. **Using Foliar fungicides to manage soybean rust: Economic importance of soybean rust**. Land Grant Universities Cooperating, NC-504, 2005.
- Ellis, R.J. and Van Der Vies, S.M. The Rubisco subunit binding protein. **Photosynthesis Research**, 16(1-2):101-115, 1988.
- Embrapa Soja: **A soja**. Londrina, 2011. Disponível em:
<http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16> Acesso em 20 de maio de 2011.
- Estévez, J.M.; Cantero, A.; Reindl, A.; Reichler, S.; León, P. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(25):22901–22909, 2001.
- Garcia A.; Calvo, E.S.; de Souza Kiihl, R.A.; Harada, A.; Hiromoto, D.M.; Vieira, L.G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, 117:545–553, 2008.

- Goellner, K.; Loehrer, M.; Langenbach, C.; Conrath, U.W.E.; Koch, E.; Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, 11(2):169–177, 2010.
- Gross, B.; Gaestel, M.; Boehm, H.; Bielka, H. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumour protein. **Nucleic Acids Research**, 17:8367, 1989.
- Hartwig, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, 26:1135-1136, 1986.
- Hasunuma, T.; Takeno, S.; Hayashi, S.; Sendai, M.; Bamba, T.; Yoshimura, S.; Tomizawa, K.; Fukusaki, E. and Miyake, C. Overexpression of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 105(5):518–526, 2008.
- Healthcare, Handbooks from GE. **2-D electrophoresis: Principles and Methods**. 2004.162p.
- Heath, M.C. Signaling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annales Botanici**, 80:713–720, 1997.
- Hidayat, O. O., and Somaatmadja, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). **Soybean Rust Newsletter**, 1:9-22, 1977.
- Hill, M.K.; Lyon, K.J.; Lyon, B.R. Identification of disease response genes expressed in *Gossypium hirsutum* upon infection with the wilt pathogen *Verticillium dahliae*. **Plant Molecular Biology**, 40:289–296, 1999.
- Iriti, M. and Faoro, F. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, 10:3371-3399, 2009.
- Julliatti, F.C.; Borges, E.N.; Passos, R.R.; Caldeira Júnior, J.C.; Brandão, A.M. Doenças da soja. **Cultivar**, 47:3-14, 2003.
- Juliatti, F.C.; Polizel, A.C.; Balardin, R.S.; Vale, F.X.R. Ferrugem da soja: epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 13:351-395, 2005.
- Júnior, S.L.B. **Análise da Expressão gênica induzida por *Phakopsora pachyrhizi* em soja**. Viçosa: UFV, 2007. 57p. Dissertação. Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.
- Krishnan, H.B.; Natarajan, S.S.; Bennett, J.O.; Sicher, R.C. Protein and metabolite composition of xylem sap from field-grown soybeans (*Glycine max*). **Planta**, 233:921–931, 2011.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680–685, 1970.

- Laxalt, A.M.; Cassia, R.O.; Sanllorenti, P.M.; Madrid, E.A.; Andreu, A.B.; Daleo, G.R.; Conde, R.D.; Lamattina, L. Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. **Plant Molecular Biology**, 30:961–972, 1996.
- Lee, J.; Bricker, T.M.; Lefevre, M.; Pinson, S.R.M.; Oard, J.H. Proteomic and genetic approaches to identifying defence-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Molecular Plant Pathology**, 7(5):405–416, 2006.
- Li, F.; Zhang, D.; Fujise, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, 276:47542–47549, 2001.
- Loake, G. and Grant, M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. **Current Opinion in Plant Biology**, 10:466–472, 2007.
- MacDonald, S.M.; Rafnar, T.; Langdon, J.; Lichtenstein, L.M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. **Science**, 269:688–690, 1995.
- Manners, J.M. and Scott, K.J. Translational activity of polysomes of barley leaves during infection by *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. **Phytopathology**, 73:1386–1392, 1983.
- Manners, J.M. and Scott, K.J. Reduced translatable messenger RNA activities in leaves of barley infected with *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. **Physiological plant pathology**, 26:297–308, 1985.
- Miles, M. R.; Frederick, R. D.; Hartman, G. L. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. Online. **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2006-0104-01-RS. Published online. 2006.
- Mortel, M.V. de; Recknor, J.C.; Graham, M.A.; Nettleton, D.; Dittman, J.D.; Nelson, R.T.; Godoy, C.V.; Abdelnoor, R.V.; Almeida, A.M.R.; Baum, T.J.; Whitham, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)**, 20:887-899, 2007.
- Mould, M.J.R. and Heath, M.C. Ultrastructural evidence of differential changes in transcription, translation, and cortical microtubules during in planta penetration of cells resistant or susceptible to rust infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55:225–236, 1999.
- Odjakova, M. and Hadjiivanova, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulg. J. Plant Physiol.**, 27(1–2):101–109, 2001.
- Pageau, K.; Reisdorf-Cren, M.; Morot-Gaudry, J.F.; Masclaux-Daubresse, C. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**, 57(3):547–557, 2006.
- Panthee, D.R.; Yuan, J.S.; Wright, D. L.; Marois, J.J.; Mailhot, D.; Stewart Jr., C. N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian

- soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional & Integrative Genomics**, 7:291–301, 2007.
- Panthee, D.R.; Marois, J.J.; Wright, D. L.; Narváez, D.; Yuan, J.S.; Stewart Jr., C. N. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. **Theoretical and Applied Genetics**, 118:359–370, 2009.
- Pham, T. A.; Miles, M. R.; Frederick, R. D.; Hill, C. B.; and Hartman, G. L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 93:224–228, 2009.
- Purdue UNIVERSITY. Asian Soybean Rust
Phakopsora pachyrhizi. Disponível em:
http://www.ppd.purdue.edu/PPDL/soybean_rust.html. **Acessado em junho de 2011.**
- Rep, M.; Dekker, H.L.; Vossen, J.H.; de Boer, A.D.; Houterman, P.M.; Speijer, D.; Back, J.W.; de Koster, C.G.; Cornelissen, B.J. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. **Plant Physiology**, 130:904–917, 2002.
- Restrepo, S.; Myers, K.L.; del Pozo, O.; Martin, G.B.; Hart, A.L.; Buell, C.R.; Fry, W.E. and Smart, C.D. Gene profiling of a compatible interaction between *phytophthora infestans* and *solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 18(9):913–922, 2005.
- Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J.V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature**, 1(6):2856–2860, 2006.
- Silva, V. A. S.; Juliatti, F. C.; Silva, L. A. S. Interação entre resistência genética parcial e fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(9):1261–1268, 2007.
- Sinclair, J.B.; Backman, P.A. **Compendium of soybean diseases**. APS Press, 3: 106p, 1989.
- Slaymaker, D.H.; Navarre, D.A.; Clark, D.; del Pozo, O.; Martin, G.B. and Klessig, D.F. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 99(18):11640–11645, 2002.
- Soares, R. M.; Rubin, S. A. L.; Wielewicki, A. P.; Ozelame, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, 34(4):1245–1247, 2004.
- Solomon, P.S.; Tan, K.C.; Oliver, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field of study. **Molecular Plant Pathology**, 4:203–210, 2003.

- Subramanian, S.; Cho, U-H.; Keyes, C.; Yu, O. Distinct changes in soybean xylem sap proteome in response to pathogenic and symbiotic microbe interactions. **BMC Plant Biology**, 9:119, 2009.
- Talbot, N.J.; McCafferty, H.R.K.; Ma, M.; Moore, K.; Hamer, J.E. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 50:179–195, 1997.
- Tani, T. and Yamamoto, H. Nucleic acid and protein synthesis in association with the resistance of oat leaves to crown rust. **Physiological plant pathology**, 12:113–121, 1978.
- Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 262p, 2008.
- Thiele, H.; Berger, M.; Skalweit, A.; Thiele, B. J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). **European Journal of Biochemistry**, 267:5473– 5481, 2000.
- Tremblay, A.; Hosseini, P.; Alkharouf, N.W.; Li, S.; Matthews, B.F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, 179:183–193, 2010.
- Wang, W.; Scali, M.; Vignani, R.; Spadafora, A.; Sensi, E.; Mazzuca, S.; Cresti, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, 24(14):2369-2375, 2003.
- Wanke, M.; Skorupinska-Tudek, K.; Swiezewska, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-Cmethyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, 48(3):663-672, 2001.
- Wilkins, M. R.; Sanches, J.C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Willians, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 13:19-50, 1995.
- Yamamoto, H.; Tani, T.; Hokin, H. Protein synthesis linked with resistance of oat leaves to crown rust fungus. **Ann. Phytopathol. Soc. Japan**, 42:583–590, 1976.
- Yorinori, J.T.; Paiva, W.M.; Frederick, R.D.; Costamilan, L.M.; Bertagnolli, P.F.; Hartman, G.E.; Godoy, C.V.; Nunes Júnior, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, 89:675-677, 2005.
- Zaffagnini, M.; Michelet, L.; Marchand, C.; Sparla, F.; Decottignies, P.; Le Maréchal, P.; Miginiac-Maslow, M.; Noctor, G.; Trost, P.; Lemaire, S.D. The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. **The FEBS Journal**, 274:212–226, 2007.

- Zhao, C.J.; Wang, A.R.; Shi, Y.J.; Wang, L.Q.; Liu, W.D.; Wang, Z.H.; Lu, G.D. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. **Theoretical and Applied Genetics**, 116:501–516, 2008.
- Zhi-lin, Y.; Chuan-chao, D.; Lian-qing, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, 6(11):1266-1271, 2007.

Capítulo 2

ANÁLISE *IN SILICO* DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE SOJA EM RESPOSTA A *Phakopsora pachyrhizi*

1.0. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas com maior importância econômica mundial. Entre os principais fatores que limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção de soja, destacam-se as doenças (Juliatti et al., 2005). A ferrugem asiática da soja (FAS), incitada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, constitui-se em um dos principais problemas na cultura da soja (Juliatti et al., 2003) e é considerada uma das doenças mais agressivas, representando uma ameaça em função dos prejuízos causados e do aumento de custo de produção para o seu controle (Embrapa Soja, 2011). Ainda não foram identificados germoplasmas com resistência genética suficiente que permita o desenvolvimento de cultivares que dispensem o uso de fungicidas para o controle da doença (Tecnologias, 2008).

Dentre os métodos usados para o controle de doenças de plantas, a resistência genética é a forma mais eficaz e econômica. Para viabilizar o uso dessa estratégia no controle da FAS, é importante estudar os genes da soja expressos diferencialmente em resposta a *P. pachyrhizi*, pois isso pode ajudar no entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença, fornecendo ferramentas para programas de melhoramento genético para a criação de cultivares resistentes à doença (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009).

Apesar de estudos moleculares sobre a resposta do hospedeiro ao patógeno estarem sendo realizados (Panthee et al., 2007; Panthee et al., 2009; Mortel et al., 2007; Júnior, 2007; Choi et al., 2008; Tremblay et al., 2010; Goellner et al., 2010; Cooper et al., 2011), há ainda poucas informações sobre a base molecular desta interação, as quais são necessárias para assistir esforços futuros para o desenvolvimento de resistência efetiva (Mortel et al., 2007; Pham et al., 2009; Tremblay et al., 2010).

Com a finalidade de ampliar os conhecimentos sobre a base molecular da resposta do hospedeiro ao patógeno, nosso grupo realizou um estudo da proteômica desta interação identificando dez proteínas diferencialmente expressas em soja em resposta a *P. pachyrhizi* (Pereira et al., 2011).

Para confirmar os resultados, foi avaliada a expressão diferencial *in silico* de duas dessas proteínas que foram mais expressas em folhas de soja no genótipo Embrapa 48, 192 horas após inoculação.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão diferencial *in silico* dos genes que codificam as enzimas anidrase carbônica e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato-redutoisomerase (DXR), visando confirmar ou refutar os dados de proteômica previamente encontrados.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

Como a soja é considerada uma espécie paleopoliplóide (Schmutz et al., 2010), há diferentes regiões codificadoras (CDS - *coding sequence*) que estão repetidas no genoma. Para determinar quais os genes e quais as sequências CDS que correspondem às proteínas anidrase carbônica e DXR e que são diferencialmente expressas em resposta à inoculação por *P. pachyrhizi*, foram coletadas várias CDS que codificam estas proteínas em soja, as quais foram analisadas (*blast analysis*) contra bancos de EST (*expressed sequence tag*) da soja.

Para cada uma das duas proteínas, a sequência de aminoácidos, em formato FASTA, de alguns organismos, foi obtida no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) após a entrada com seus respectivos nomes. Cada uma destas sequências foi analisada (TBLASTN) contra o banco de dados da soja no Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>). Foram coletadas todas as sequências de transcritos (CDS) que neste BLAST apresentaram um E-value menor que 10^{-5} . Cada uma destas sequências CDS foi submetida ao banco de dados contendo diferentes bibliotecas de ESTs da soja depositadas no Soybase (<http://soybase.org/GlycineBlastPages/>). Foi observada a expressão destas CDS em bibliotecas de ESTs de folha, raiz, caule, semente, do estágio de desenvolvimento da planta e da folha em resposta ao *P. pachyrhizi*. Para cada sequência CDS, foi observado o número total de *hits* ou a ausência de *hit* com as sequências de ESTs depositadas nestas bibliotecas. As sequências CDS, relacionadas a estas duas proteínas, que apresentaram *hit* com ESTs depositadas na biblioteca de sequências expressas em folhas em resposta à inoculação com o fungo, foram úteis na confirmação dos nossos dados obtidos pela análise proteômica.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a enzima anidrase carbônica, foram obtidas sequências de aminoácidos de sete espécies (*Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Hordeum vulgare*, *Lotus japonicus*, *Populus trichocarpa*) pelo NCBI e para a DXR foram obtidas sequências de duas espécies (*Arabidopsis thaliana* e *Arabidopsis lyrata lyrata*). A análise destas sequências submetidas ao banco de dados da soja no Phytozome (TBLASTN), permitiu a detecção de, respectivamente, 45 e 6 sequências CDS para a anidrase carbônica e DXR.

Ao submeter estas sequências CDS ao banco de dados contendo várias bibliotecas de ESTs da soja depositadas no Soybase, foi observado que, para a anidrase carbônica, os transcritos codificados por genes localizados nos cromossomos 19 e 5 apresentaram um maior número de *hits* com sequências expressas em folhas inoculadas com *P. pachyrhizi*, conforme mostra a figura 1.

A figura 2 apresenta o número de *hits* das CDS para a enzima DXR com sequências expressas em folhas após inoculação com o fungo. Observa-se que transcritos codificados por genes localizados nos cromossomos 5, 16 e 17 apresentaram expressão em resposta a *P. pachyrhizi*.

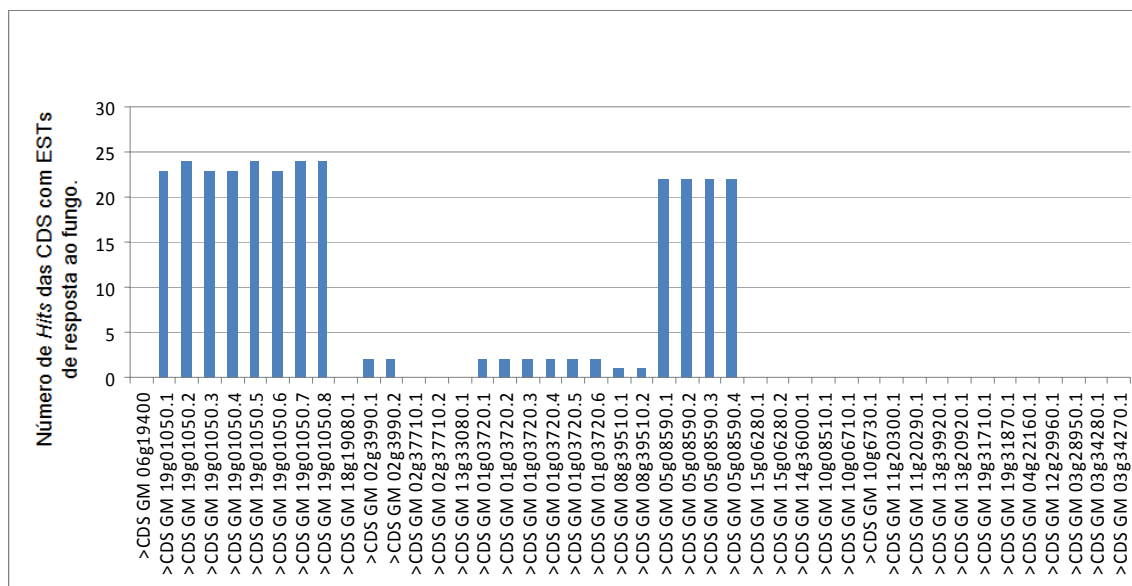


Figura 1. Número de *hits* das CDS da anidrase carbônica com ESTs de resposta a *Phakopsora pachyrhizi*.

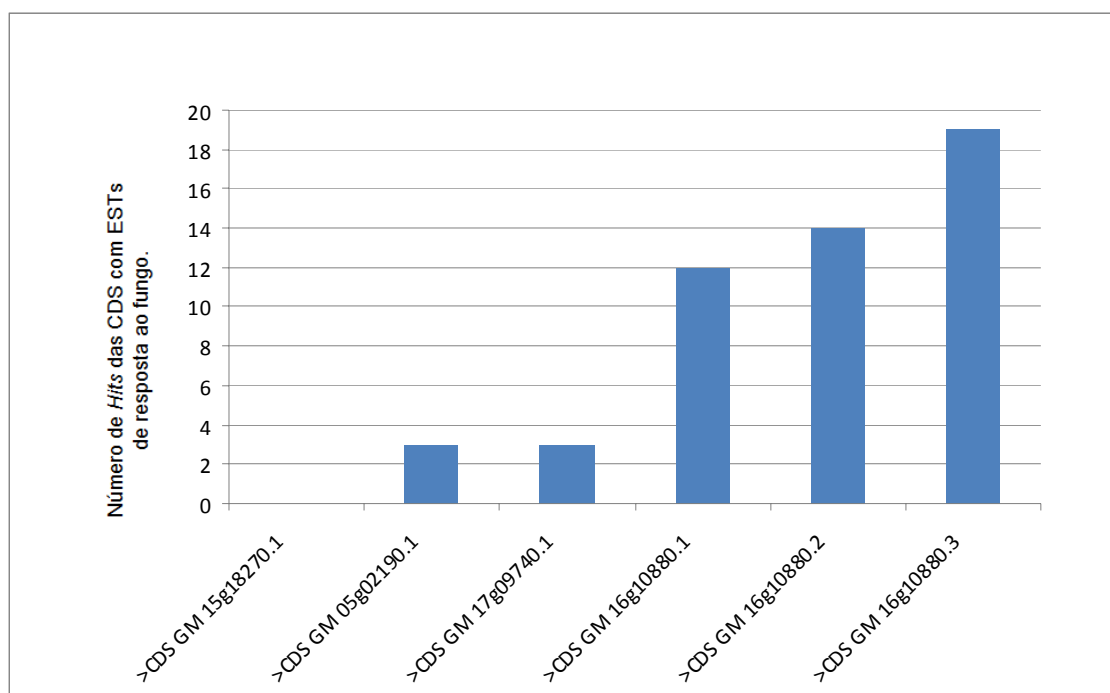


Figura 2. Número de *hits* das CDS da enzima DXR com ESTs de resposta a *Phakopsora pachyrhizi*.

A análise da expressão diferencial *in silico* para estas proteínas, corrobora os resultados encontrados em análise proteômica. Dados de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas revelaram, em nossos trabalhos anteriores, que estas proteínas foram mais expressas em soja no genótipo Embrapa 48 após 192 horas de inoculação com o *P. pachyrhizi*. Os dados de análise *in silico* somam-se aos já encontrados reforçando a idéia de que estes genes realmente estão envolvidos com a resposta do hospedeiro à doença. Nestas análises, observamos que genes localizados nos cromossomos 5 e 19 codificam transcritos da anidrase carbônica que estão envolvidos com a resposta à ferrugem asiática da soja. Do mesmo modo, estas análises permitem a observação de que os cromossomos 5, 16 e 17 codificam transcritos para a enzima DXR cuja expressão está envolvida com a resposta celular da soja ao fungo.

Estudos mostram que estas proteínas estão potencialmente envolvidas com mecanismos de defesa em plantas contra o ataque de patógenos. Slaymaker et al. (2002) revelaram que a anidrase carbônica é uma proteína efetora do ácido salicílico e que este composto está envolvido com as respostas de defesa local e sistêmica. A enzima DXR é ponto chave na via metabólica MEP (2C-metil-D-eritritol 4-fosfato) que é o precursor do isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), os quais são os precursores da síntese de isoprenóides (Hasunuma et al., 2008; Estévez et al., 2001). Wanke et al. (2001) afirmam que isoprenóides, estão relacionados à defesa contra o

ataque de patógenos. Hasunuma et al. (2008) citam vários trabalhos que permitem a conclusão de que a enzima DXR é uma das enzimas principais e controladoras da via metabólica MEP e correlacionam o aumento da expressão gênica de DXR com o aumento na produção de isoprenóides. Dentre algumas alterações metabólicas que ocorrem durante a resistência adquirida local em plantas, uma delas é a estimulação das vias de metabolismo secundário, algumas das quais produzem compostos de baixo peso molecular e com atividade antibiótica como as fitoalexinas (Ođjakova and Hadjiivanova, 2001). As fitoalexinas são um grupo específico de isoprenóides conhecidos como diterpenos que são terpenóides (ou isoprenóides) que apresentam 20 átomos de carbono em sua estrutura molecular (Iriti and Faoro, 2009). Zhi-lin et al. (2007) citam a via metabólica MEP como uma das que são induzidas por fungos endofíticos.

4.0. CONCLUSÕES

Os dados encontrados pela análise proteômica e pela análise de expressão diferencial *in silico*, somados aos possíveis significados bioquímico-fisiológicos da anidrase carbônica e DXR, indicam que elas exercem papéis importantes durante a resposta da soja a *P. pachyrhizi*.

Referências Bibliográficas.

- Choi, J.; Alkharouf, N.; Schneider, K.; Matthews, B.; Frederick, R. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. **Functional & Integrative Genomics**, 8:314–359, 2008.
- Cooper, B.; Campbell, K.B.; Feng, J.; Garrett, W.M. and Frederick, R. Nuclear proteomic changes linked to soybean rust resistance. **Molecular BioSystems**, 7:773–783, 2011.
- Embrapa Soja: **A soja**. Londrina, 2011. Disponível em:
<http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16> Acesso em 20 de maio de 2011.
- Estévez, J.M.; Cantero, A.; Reindl, A.; Reichler, S. and León, P. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(25):22901–22909, 2001.
- Goellner, K.; Loehrer, M.; Langenbach, C.; Conrath, U.W.E.; Koch, E.; Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, 11(2):169–177, 2010.
- Hasunuma, T.; Takeno, S.; Hayashi, S.; Sendai, M.; Bamba, T.; Yoshimura, S.; Tomizawa, K.; Fukusaki, E. and Miyake, C. Overexpression of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 105(5):518–526, 2008.
- Iriti, M. and Faoro, F. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, 10:3371-3399, 2009.
- Julliatti, F.C.; Borges, E.N.; Passos, R.R.; Caldeira Júnior, J.C.; Brandão, A.M. Doenças da soja. **Cultivar**, 47:3-14, 2003.
- Juliatti, F.C.; Polizel, A.C.; Balardin, R.S.; Vale, F.X.R. Ferrugem da soja: epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 13:351-395, 2005.
- Júnior, S.L.B. **Análise da Expressão gênica induzida por *Phakopsora pachyrhizi* em soja**. Viçosa: UFV, 2007. 57p. Dissertação. Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.
- Mortel, M.V. de; Recknor, J.C.; Graham, M.A.; Nettleton, D.; Dittman, J.D.; Nelson, R.T.; Godoy, C.V.; Abdelnoor, R.V.; Almeida, A.M.R.; Baum, T.J.; Whitham, S.A. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)**, 20:887-899, 2007.
- Odjakova, M. and Hadjiivanova, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulg. J. Plant Physiol.**, 27(1–2):101–109, 2001.
- Panthee, D.R.; Yuan, J.S.; Wright, D. L.; Marois, J.J.; Mailhot, D.; Stewart Jr., C. N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian

- soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional & Integrative Genomics**, 7:291–301, 2007.
- Panthee, D.R.; Marois, J.J.; Wright, D. L.; Narváez, D.; Yuan, J.S.; Stewart Jr., C. N. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific. **Theoretical and Applied Genetics**, 118:359–370, 2009.
- Pereira, M.R.; Gouveia, B.C.; Marcelino, F.C.; Ramos, H.J.O.; Moreira, M.A.; Barros, E.G. Identificação de proteínas expressas em folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em resposta à inoculação por *Phakopsora pachyrhizi*. In: 6º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2011, Búzios – RJ. **RESUMOS**.
- Pham, T. A.; Miles, M. R.; Frederick, R. D.; Hill, C. B.; and Hartman, G. L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, 93:224–228, 2009.
- Schmutz, J.; Cannon, S.B.; Schlueter, J.; Ma, J.; Mitros, T.; Nelson, W.; Hyten, D.L.; Song, Q.; Thelen, J.J.; Cheng, J.; Xu, D.; Hellsten, U.; May, G.D.; Yu, Y.; Sakurai, T.; Umezawa, T.; Bhattacharyya, M.K.; Sandhu, D.; Valliyodan, B.; Lindquist, E.; Peto, M.; Grant, D.; Shu, S.; Goodstein, D.; Barry, K.; Futrell-Griggs, M.; Abernathy, B.; Du, J.; Tian, Z.; Zhu, L.; Gill, N.; Joshi, T.; Libault, M.; Sethuraman, A.; Zhang, X.; Shinozaki, K.; Nguyen, H.T.; Wing, R.A.; Cregan, P.; Specht, J.; Grimwood, J.; Rokhsar, D.; Stacey, G.; Shoemaker, R.C. and Jackson, S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, 463:178–183, 2010.
- Slaymaker, D.H.; Navarre, D.A.; Clark, D.; del Pozo, O.; Martin, G.B. and Klessig, D.F. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 99(18):11640–11645, 2002.
- Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 262p, 2008.
- Tremblay, A.; Hosseini, P.; Alkharouf, N.W.; Li, S.; Matthews, B.F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, 179:183–193, 2010.
- Wanke, M.; Skorupinska-Tudek, K. and Swiezewska, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-Cmethyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, 48(3):663–672, 2001.
- Zhi-lin, Y.; Chuan-chao, D. and Lian-qing, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, 6(11):1266–1271, 2007.