

POLIENE MARTINS COSTA

**CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES DE
Phakopsora pachyrhizi QUE CODIFICAM PROTEÍNAS SECRETADAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

T

C837c
2010
Costa, Poliene Martins, 1984-
Caracterização e expressão transiente de genes de
Phakopsora pachyrhizi que codificam proteínas secretadas /
Poliene Martins Costa. – Viçosa, MG, 2010.
viii, 73f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 64-73.

1. *Phakopsora pachyrhizi*. 2. Ferrugem-da-soja. 3. Soja.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.592

POLIENE MARTINS COSTA

**CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES DE
Phakopsora pachyrhizi QUE CODIFICAM PROTEÍNAS SECRETADAS**

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

APROVADA: 27 de agosto de 2010.

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Coorientador)

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Coorientadora)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Ary Corrêa Júnior

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença permanente na minha vida, pela paz, orientação e bênçãos.

Aos meus amados pais, Francisco e Marieta, pela força constante, por sempre acreditarem intensamente no meu sucesso e, sobretudo, pelos inúmeros conselhos. À minha maninha Lélis, pelo intenso carinho. E ao meu afilhado Vitor, pelo amor angelical.

À família do laboratório de genômica, Lívia, Sandra, Gustavo, Michelle, Jamile, Tadeu, Ricardo, Cynthia, Luís, Gabriela, Daniela, Daniel, Elias, Thiago, pela amizade, pela solidariedade diária e pelas festinhas surpresas de aniversário.

Às minhas amigas Rhayrane, Marcela, Dalila, Deisy, Michele, Érica, pelo apoio, carinho, momentos únicos.

Às minhas amigas Mariana, Bárbara e Patrícia, pela amizade fortalecida em pouco tempo e tão especial.

Ao meu orientador, professor Sérgio Hermínio Bromonschenkel, pela orientação durante a execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia, ao Núcleo de Biotecnologia aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) pela formação científica e profissional.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1- INTRODUÇÃO GERAL	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 – Aspectos gerais do patossistema <i>Glycine max</i> – <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	4
2.1.1 - Cultura da soja	4
2.1.2 – Ferrugem asiática da soja	4
2.1.3 – Agente etiológico da ferrugem asiática da soja	5
2.1.4 – Sintomas da doença.....	6
2.1.5 – Ciclo da doença.....	6
2.1.6 – Gama de hospedeiros e infecções de <i>P. pachyrhizi</i> em plantas hospedeiras.....	9
2.1.7 – Medidas de controle da doença.....	10
2.2 – Efeitos.....	11
2.2.1- Descoberta dos efeitos.....	11
2.2.2 – Caracterização dos efeitos	13
CAPÍTULO 1	22
REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE <i>Glycine max</i> AO ISOLADO MONOPUSTULAR PPUFV02 DE <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	22
RESUMO	22
1-INTRODUÇÃO	24
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1- Obtenção e multiplicação do isolado monopustular PPUFV02	27
2.2- Material vegetal, cultivo das plantas e inoculação.....	27
2.3- Avaliação da resistência ao isolado monopustular de <i>P. pachyrhizi</i>	30
3- RESULTADOS.....	31
4- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	37
CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES DE <i>Phakopsora</i> <i>pachyrhizi</i> QUE CODIFICAM PROTEÍNAS SECRETADAS	40
RESUMO	40
1-INTRODUÇÃO	41
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 – Obtenção da sequência completa dos genes selecionados	43

2.2 – Amplificação e clonagem das sequências abertas de leitura (ORFs) no vetor pYST-1	43
2.3 – Clonagem das ORFs no vetor pENTR™ do sistema Gateway® (Invitrogen) .	45
2.4- Expressão transiente dos genes em folhas de tabaco por meio de agroinfiltração	46
3 - RESULTADOS.....	48
4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	59
5 – CONCLUSÕES GERAIS.....	63
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

COSTA, Poliene Martins. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Caracterização e expressão transiente de genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Marisa Vieira de Queiroz.

Durante a sua interação com os hospedeiros, os fungos causadores de ferrugens secretam e translocam proteínas para o citoplasma da célula vegetal. Sabe-se hoje, que os genes *Avr* codificam proteínas efetoras que são reconhecidas por proteínas codificadas por genes *R*. A natureza e função dos genes *Avr* de *Phakopsora pachyrhizi* são desconhecidas. Recentemente, seqüências parciais de cDNAs que codificam proteínas secretadas pelo isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foram identificadas por meio da utilização do sistema *Yeast Secretion Trap*. Dando continuidade à caracterização do secretoma deste isolado visando a identificação de genes *Avr*, o presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: (1) avaliar e caracterizar a reação de 33 genótipos de soja ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, visando subsidiar futuros estudos funcionais de genes candidatos a serem genes *Avr*; (2) obter a seqüência completa e efetuar a expressão transiente em tabaco de seis genes do isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas. O isolado PPUFV02 foi avirulento nos genótipos de soja PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487 e PI 471904 que contêm, respectivamente, os genes de resistência *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp4*, *Rpp5*. A resistência desses genótipos se manifestou na forma de lesões tipo RB. Foi verificado também a ocorrência de lesões tipo RB nos genótipos de soja PI 587880-A, PI 594767-A, PI 561356, PI 587905 e ausência de sintomas no genótipo PI 594754. Foram obtidas as seqüências completas de seis genes que codificam proteínas secretadas com características típicas de efetores, ou seja, são proteínas de função desconhecida, pequenas (<400 aa), com peptídeo sinal de secreção na região N-terminal e algumas delas com resíduos de cisteína capazes de formar pontes de dissulfeto. Estudos

preliminares de agroinfiltração em tabaco revelaram que três genes codificam proteínas capazes de induzir necrose em tabaco. Esse resultado é consistente com o mecanismo de patogênese de *P. pachyrhizi*. Todavia, estudos adicionais são necessários para confirmar os resultados obtidos em tabaco e para verificar se os mesmos resultados são obtidos em outras plantas não hospedeiras e em soja.

ABSTRACT

COSTA, Poliene Martins. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August, 2010. **Characterization and transient expression of genes that encode proteins secreted by *Phakopsora pachyrhizi***. Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Marisa Vieira de Queiroz.

Rust fungi secrete and translocate proteins into the cytoplasm of plant cells during host-parasite interaction. Nowadays, it's known that *Avr* genes encode effector proteins that are recognized by proteins encoded by *R* genes. However, it's still unknown the nature and the function of *Avr* genes of the fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Recently, the use of the Yeast Secretion Trap system allowed the identification of partial sequences of cDNAs that encode proteins secreted by the monopustular isolate PPUFV02 of *P. pachyrhizi*. In order to keep on the secretome characterization of this isolate to identify *Avr* genes, this work was developed with two purposes: (1) to evaluate and to characterize the reaction of 33 soybean genotypes to *P. pachyrhizi* monopustular isolate PPUFV02 in order to support future functional studies of candidate *Avr* genes, (2) to obtain the complete sequence and analyse the transient expression in tobacco of six genes from *P. pachyrhizi* monopustular isolate PPUFV02 that encode secreted proteins. The isolate PPUFV02 was avirulent in the soybean genotypes PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487 and PI 471904 which contain, respectively, the resistance genes *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp4*, *Rpp5*. The resistance of these genotypes was detected by RB lesions. We also verified the occurrence of RB lesions in the soybean genotypes PI 587880-A, PI 594767-A, PI 561356, PI 587905 and the absence of symptoms in PI 594754 genotype after the inoculation with isolate PPUFV02 of *P. pachyrhizi*. It was obtained the complete sequences of six genes that encode secreted proteins. They presented typical characteristics of effectors as small proteins (<400 aa) with unknown function, proteins with secretion signal peptide at the N-terminal region and some of the proteins with cysteine residues that could form disulfide bonds. Preliminary studies of agroinfiltration in tobacco revealed that

three genes encode proteins able to induce necrosis in this plant. This result is consistent with the mechanism of *P. pachyrhizi* pathogenesis. However, further studies are needed to confirm the results obtained in tobacco and to verify whether the same results are obtained in other non-host plants and in soybean.

1- INTRODUÇÃO GERAL

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é originária da Ásia, onde é cultivada há milhares de anos. Atualmente, é plantada em todo o mundo. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo com produção de 57,1 milhões de toneladas e área plantada correspondente a 21,7 milhões de hectares na safra de 2008/2009 (Embrapa Soja, 2010). A ferrugem asiática da soja (FAS) causada pelo fungo basidiomiceto *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), é a principal doença da cultura. O montante de perdas em grãos no Brasil causada por essa doença foi estimado em 571,8 mil toneladas, o equivalente a cerca de US\$71,7 milhões na safra 2008/2009 (Embrapa Soja, 2010). Nesta mesma safra, os gastos com fungicidas, os custos operacionais das aplicações, as perdas de produção e redução na arrecadação de impostos totalizaram aproximadamente US\$ 1,67 bilhões, representando um custo “ferrugem” de US\$ 1,74 bilhões (Embrapa Soja, 2010). A ferrugem não reduz somente o rendimento, mas também afeta negativamente a qualidade dos grãos, diminuindo seu peso (Webb & Fellers, 2006).

A utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada e o monitoramento constante da lavoura associado ao controle químico com fungicidas são as medidas de manejo recomendadas para a redução dos danos causados por essa doença. Os triazóis e estrobilurinas são os fungicidas mais utilizados no controle da FAS no Brasil, sendo o gasto com fungicidas na cultura da soja equivalente a 54% do total de gastos em fungicidas aplicados nas principais culturas em 2008, ou seja, aproximadamente US\$ 800 milhões (Godoy, dados não publicados).

Além disso, em 2007, foi publicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Instrução Normativa Número 2, de 29 de janeiro de 2007, instituindo o [Programa Nacional de Controle da Ferrugem Asiática da Soja \(PNCFS\)](#), no qual, entre outras diretrizes, ficou estabelecido que os Estados deveriam criar seus Comitês Estaduais de Controle da Ferrugem Asiática da Soja e que as instâncias intermediárias do

Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) em cada Estado, deveriam estabelecer um calendário de semeadura de soja, com um período de, pelo menos 60 dias sem a presença de plantas cultivadas ou voluntárias. Essa medida, conhecida como “vazio fitossanitário”, visa reduzir a quantidade de uredósporos no ambiente na entressafra e, dessa forma, diminuir a infecção precoce da soja, pela menor quantidade de inóculo inicial, reduzindo os custos de controle da doença.

A utilização de variedades resistentes seria a medida ideal de controle da FAS por reduzir os custos de produção e impactos ambientais decorrentes de aplicações de fungicidas. Cinco locos gênicos denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* que conferem resistência à FAS já foram descritos (McLean & Byth, 1980; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia *et al.*, 2008), sendo que o loco *Rpp1* contém um alelo, *Rpp1b*, associado a resistência à FAS (Chakraborty *et al.*, 2009) e o loco *Rpp5* contém dois alelos dominantes e um recessivo de resistência (Garcia *et al.*, 2008). Recentemente, foram liberadas três cultivares comerciais de soja resistentes à *P. pachyrhizi*, BRSGO 7560, TMG 801 e TMG 803 (Godoy, dados não publicados). No entanto, a durabilidade dessa resistência no campo é duvidosa em função da variabilidade genética de *P. pachyrhizi* (Oliveira *et al.*, 2005), sendo recomendada a sua utilização associada à aplicação de fungicidas, o que daria maior estabilidade no controle da doença, em casos do retardamento da aplicação dos fungicidas.

Como demonstrado por Flor (1942), em seus estudos genéticos no patossistema ferrugem do linho-linho, o fenótipo de uma interação patógeno-hospedeiro é determinado pela existência de genes de resistência dominantes no hospedeiro (genes *R*) e genes de avirulência dominantes correspondentes no patógeno (genes *Avr*). Assim, mutações nos genes *Avr*, permitem que os patógenos suplantem a resistência conferidas pelos genes *R* (Jones & Dangl, 2006). Portanto, os genes *Avr* desempenham um papel fundamental no fenótipo das interações patógeno-hospedeiro, determinando a gama de plantas hospedeiras ou não hospedeiras de um determinado patógeno (Dangl & McDowell, 2006).

Durante a sua interação com os hospedeiros, os fungos causadores de ferrugens secretam e translocam proteínas para o citoplasma da célula vegetal. Estas proteínas por estarem relacionadas com a modificação da estrutura ou função dos componentes celulares do hospedeiro, influenciando na agressividade e virulência dos fungos e resposta imune da planta, são denominadas proteínas efetoras (Mendgen & Hahn, 2002). Sabe-se hoje, que os genes *Avr* codificam proteínas efetoras que são reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes *R*. Este reconhecimento desencadeia várias cascatas de transdução de sinais que resultam na contenção do patógeno no sítio inicial de infecção, muitas vezes pela ativação da reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela morte das células vegetais no sítio de infecção (Jones & Dangl, 2006).

A natureza e função das proteínas secretadas por *P. pachyrhizi* são desconhecidas. Recentemente, sequências parciais de cDNAs que codificam proteínas secretadas pelo isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foram identificadas por meio da utilização do sistema *Yeast Secretion Trap* proposto por Lee *et al.* (2006) (Brommonschenkel *et al.*, 2009). Dando continuidade à caracterização do secretoma deste isolado, o presente trabalho foi desenvolvido com o seguinte objetivo geral: caracterizar e analisar a função de seis genes de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas solúveis secretadas durante sua interação com a soja. Os objetivos específicos foram: avaliar e caracterizar a reação de 33 genótipos de soja ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, visando subsidiar futuros estudos funcionais direcionados à identificação de genes *Avr* desse isolado (Capítulo 1); obter as sequências completas e efetuar a expressão transiente em tabaco dos seis genes do isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas (Capítulo 2).

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Aspectos gerais do patossistema *Glycine max* – *Phakopsora pachyrhizi*

2.1.1 - Cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta da família Fabaceae originária de plantas rasteiras ancestrais que se desenvolviam na costa leste da Ásia, na China. Esta leguminosa é valorizada pelo teor e qualidade protéica de seu farelo, constituindo a base de ingredientes de massas, cereais, bebidas e alimentos dietéticos. A soja também é muito usada pela indústria de alimentação animal. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo, é produzida a lecitina, um agente emulsificante, muito usada na fabricação de salsichas, maioneses, achocolatados, entre outros produtos (Embrapa Soja, 2010). Recentemente, a soja vem crescendo como fonte alternativa de combustível, o biodiesel da soja (Embrapa Soja, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2008/2009, a cultura da soja ocupou uma área de 21,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 57,1 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 2629 kg por hectare, alcançando cerca de 3082 kg/ha no estado de Mato Grosso, maior estado produtor brasileiro de soja (Embrapa Soja, 2010).

2.1.2 – Ferrugem asiática da soja

Dentre as várias doenças que podem prejudicar a produção de soja, a ferrugem asiática é a de maior preocupação, devido ao seu poder destrutivo (Furtado, 2007). Essa doença foi descrita, primeiramente, no Japão há mais de 100 anos (Bromfield & Hartwig, 1980). A doença espalhou-se da Ásia para a África (Ono *et al.*, 1992), América do Norte (Schneider *et al.*, 2005) e

América do Sul (Yorinori *et al.*, 2005). No Brasil, a doença foi constatada na região do Sul em 2001 e rapidamente espalhou-se para a região central no ano seguinte (Yorinori *et al.*, 2005), estando atualmente disseminada nas regiões produtoras do país (Consórcio Antiferrugem – Embrapa Soja, 2010).

2.1.3 – Agente etiológico da ferrugem asiática da soja

Patógenos biotróficos apresentam um tipo de parasitismo específico em que são absolutamente dependentes do tecido vivo do hospedeiro para completar o ciclo de vida (Voegelé *et al.*, 2009). O fungo biotrófico obrigatório diferencia-se dos fungos hemibiotróficos ou necrotróficos por: (a) não serem cultivados *in vitro*; (b) formarem estruturas de infecção altamente desenvolvidas; (c) apresentarem atividade secretória limitada, especialmente de enzimas líticas; (d) possuírem uma zona de contato estreita separando a membrana do fungo e da planta; (e) conseguirem suprimir a longo prazo as respostas de defesa da planta; (e) formarem haustório (Voegelé *et al.*, 2009).

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), agente etiológico da ferrugem asiática da soja pertence ao gênero *Phakopsora*, filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae. A ferrugem asiática da soja é considerada a doença foliar mais destrutiva desta cultura (Yorinori *et al.*, 2005). Além de *P. pachyrhizi*, a espécie *P. meibomiae* (Arthur) Arthur é capaz de causar em soja a doença conhecida como ferrugem americana, de pouca importância econômica (Ono *et al.*, 1992). As características morfológicas das duas espécies de *Phakopsora* geralmente não permitem a sua diferenciação, a qual somente é feita por meio de análises moleculares. A determinação da sequência de nucleotídeos da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal (rDNA) revelou mais de 99% de identidade dentre os isolados de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*, mas apenas 80% de identidade entre as duas espécies (Frederick *et al.*, 2002).

2.1.4 – Sintomas da doença

Os sintomas iniciais da doença caracterizam-se por pequenas pústulas foliares, de coloração castanha a marrom escura. Na face inferior da folha, pode-se observar uma ou mais urédias que se rompem, liberando os uredósporos. As lesões tendem para o formato angular e podem atingir de 2 a 5 mm de diâmetro, podendo aparecer em pecíolos, vagens e caules. Porém, as lesões são mais abundantes nas folhas, principalmente na superfície inferior, onde podem ocupar extensas áreas e, ao longo do tempo, as folhas de soja podem amarelecer e cair (Sinclair & Hartman, 1999). Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o enchimento de vagens e o peso final do grão. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho do grão e, conseqüentemente, maior a perda de rendimento e qualidade (Yang *et al.*, 1991).

2.1.5 – Ciclo da doença

Não há informações sobre a reprodução sexual do fungo *P. pachyrhizi*. Apesar de teliósporos terem sido observados em vários hospedeiros na Ásia, incluindo soja, a germinação deles nunca foi relatada na natureza (Bromfield, 1984). Entretanto, a germinação de teliósporos e a formação de basidiósporos podem ser induzidas sob condições controladas em laboratório (Saksirirat & Hoppe, 1991). No entanto, não há informações sobre o processo de infecção basidial ou se *P. pachyrhizi* é autoécia ou heteroécia.

A espécie *P. pachyrhizi* forma uredósporos em urédias de cinco a oito dias após a inoculação sobre folhas de plantas suscetíveis (Fig. 1d). Os uredósporos são liberados da urédia e dispersos pelo vento. Sob condições apropriadas, temperatura entre 18 e 26°C e período mínimo de molhamento

foliar de seis horas, os uredósporos germinam produzindo um tubo germinativo (Alves *et al.*, 2005). Este tubo forma em sua extremidade uma estrutura globosa, o apressório, aproximadamente do mesmo tamanho que o uredósporo (Fig. 1b). Em contraste à maioria das ferrugens, *P. pachyrhizi* penetra diretamente no tecido foliar (Fig. 2). A penetração inicia-se pela formação de uma estrutura afunilada, denominada de cone apressorial, dentro do apressório (Fig. 2) (Koch *et al.*, 1983). Este cone é contíguo com a parede celular da hifa de penetração formada dentro da célula epidérmica, também denominada de vesícula transepidermal (Bromfield, 1984). As células da epiderme penetradas pelo fungo tornam-se desorganizadas e necrosam (Figs. 1e e 2) (Keogh *et al.*, 1980). A hifa de penetração cresce através da célula epidérmica e atinge o espaço intercelular, sendo separada da hifa primária que emerge por um septo (Koch *et al.*, 1983). A hifa primária se ramifica formando hifas secundárias. Estas hifas em contato com células do mesófilo diferenciam-se em células mãe do haustório (Fig. 1c). A formação do haustório primário é observada de 24 a 48h após o primeiro contato entre os uredósporos e o hospedeiro suscetível (Fig. 1c), (Koch *et al.*, 1983).

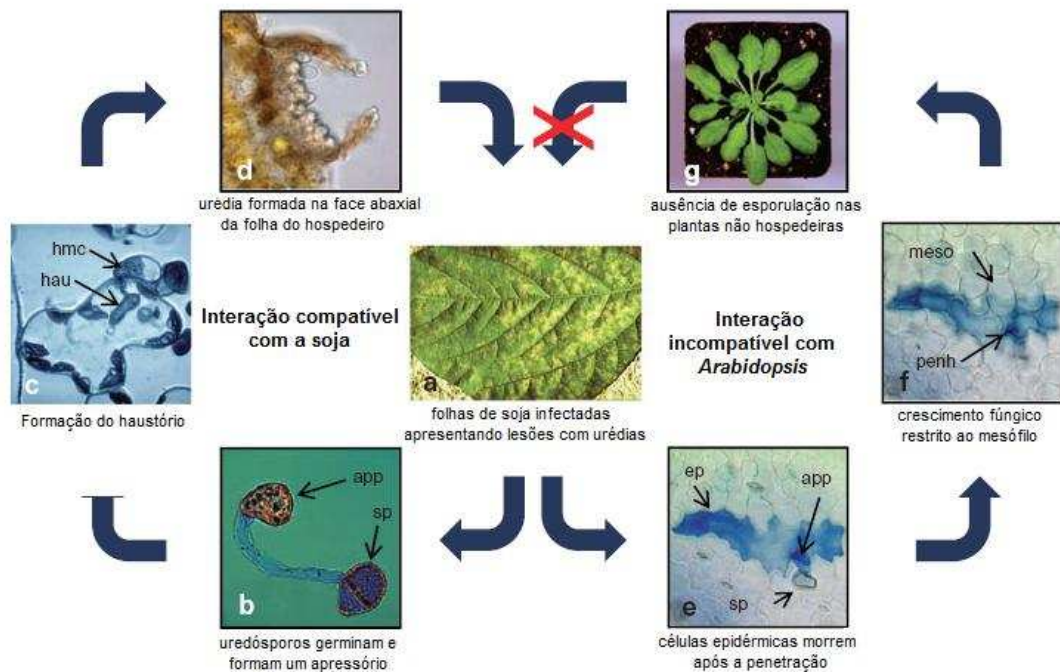


Figura 1. Interação compatível entre *P. pachyrhizi* e a soja (hospedeiro) e incompatível deste patógeno com a planta *Arabidopsis* (não hospedeiro). a) Durante o processo de infecção, o patógeno forma urédias localizadas na face abaxial da folha. Novos uredósporos formados são dispersos pelo vento. b) Esporos depositados sobre a superfície foliar germinam e formam apressório. c) Hifa intercelular forma células mãe haustoriais de onde o haustório desenvolve-se dentro do mesófilo. d) O ciclo de vida de *P. pachyrhizi* completa-se com a formação de uredósporos na urédia. e) Na interação incompatível, os uredósporos germinam, formam apressório, ocorrendo a penetração das células epidérmicas, característica comum com a interação compatível. f) O crescimento fúngico fica restrito ao mesófilo. Fotos mostradas nas letras “e” e “f” são secções ópticas do mesmo local de infecção tanto na camada epidermal quanto no mesófilo. g) *P. pachyrhizi* não tem a capacidade de completar o ciclo de vida e não esporula em plantas de *Arabidopsis*. sp, uredósporo; app, apressório; epi, célula epidérmica; hau, haustório; hms, célula mãe haustorial; penh, hifa de penetração; meso, célula do mesófilo. Adaptado de Goellner *et al.*, 2010.

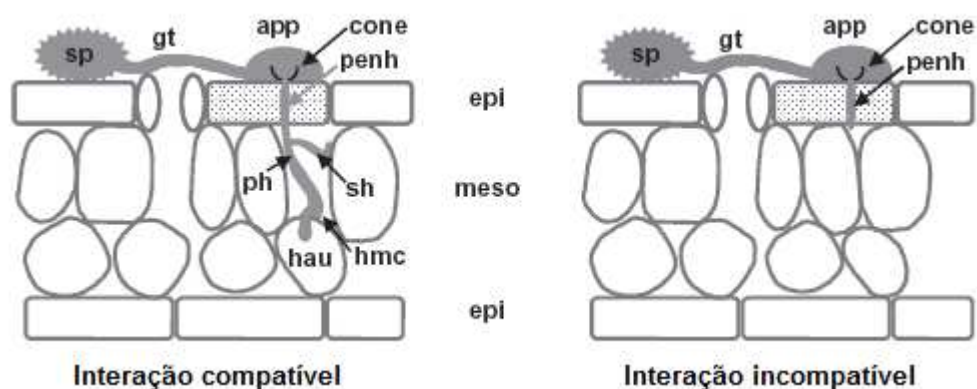


Figura 2. Estágios iniciais de desenvolvimento de *P. pachyrhizi* durante as interações deste patógeno com planta hospedeira e não hospedeira. Os uredósporos (sp) germinam produzindo um tubo germinativo (gt) que formam o apressório (app). Uma estrutura afunilada, o cone apressorial se forma dentro do apressório. Este origina a hifa de penetração (penh) que penetra as células epidérmicas (epi). Estas células, por consequência, morrem (pontilhado). No espaço intercelular do mesófilo, uma hifa primária (ph) é separada da hifa de penetração por um septo e ramifica-se em várias hifas secundárias (sh). Finalmente, a célula mãe haustorial (hmc) é formada no local de contato da hifa secundária com as células do mesófilo (meso), que diferencia o haustório (hau) no interior da célula do mesófilo, estabelecendo a interação compatível. Lado esquerdo: interação compatível mostrando todos os estágios de desenvolvimento da infecção; lado direito: interação incompatível em plantas de *Arabidopsis*, por exemplo, onde a infecção pelo fungo é interrompida após a penetração das células epidérmicas. Adaptado de Koch *et al.* (1983).

2.1.6 – Gama de hospedeiros e infecções de *P. pachyrhizi* em plantas hospedeiras

Além da soja, *P. pachyrhizi* é capaz de infectar mais de 60 espécies em pelo menos 26 gêneros de leguminosas (Ono *et al.*, 1992). Bromfield (1984) relata três tipos de reações decorrentes da infecção de *P. pachyrhizi* em plantas hospedeiras: TAN (lesões castanho clara), RB (lesões castanho escuro) e imunidade. A reação TAN indica suscetibilidade do hospedeiro com a formação de urédias esporulantes, enquanto que em cultivares resistentes desenvolve-se as lesões RB com pouca ou nenhuma esporulação. O número médio de urédias sobre a superfície abaxial da folha varia de 2 a 5 por lesão TAN e de 0 a 2 por lesão RB. O fenótipo imune

corresponde a uma interação incompatível sem sintomas visíveis da doença nas folhas do hospedeiro.

As respostas de suscetibilidade, resistência e imunidade em folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi* refletem diferentes eventos citológicos. As primeiras células necróticas são formadas às 24 horas após a inoculação (hpi) tanto nos hospedeiros de soja suscetíveis, resistentes e imunes ao fungo. Após as 24 hpi, a interrupção do crescimento fúngico é associada com o rápido aumento do número de células necróticas no hospedeiro imune entre 24 e 72 hpi, visível apenas microscopicamente. Em contraste, no hospedeiro resistente, a expansão da hifa fúngica prossegue por até 120 hpi e, por consequência, a zona necrótica torna-se maior e visível macroscopicamente. Os sintomas macroscópicos de infecção são caracterizados como manchas “flecks” similares a uma reação de HR. Entretanto, no genótipo suscetível, a zona necrótica aumenta ao mesmo tempo em que a hifa fúngica desenvolve-se até às 240 hpi, quando os uredósporos são liberados das urédias (McLean, 1979). Os parasitas mais especializados, como as ferrugens, causam necrose no tecido dos hospedeiros suscetíveis ao longo do processo infeccioso, até o momento em que ocorre a esporulação (Shaw, 1963).

2.1.7 – Medidas de controle da doença

Como medidas de controle da ferrugem tem-se sugerido: 1) aplicação do “vazio fitossanitário”, isto é, o estabelecimento de um calendário de semeadura de soja, com um período de pelo menos 60 dias sem a presença de plantas cultivadas ou voluntárias. Essa medida visa reduzir a quantidade de uredósporos no ambiente na entressafra e, dessa forma, diminuir a infecção precoce da soja, reduzindo os custos de controle da doença. de acordo com o [Programa Nacional de Controle da Ferrugem Asiática da Soja \(PNCFS\)](#); 2) a semeadura de cultivares mais precoces e no início da época recomendada para cada região, a fim de evitar o período de maior

quantidade de inóculo do fungo; 3) evitar cultivos adensados para facilitar a aplicação de fungicidas protetores ou sistêmicos; 4) monitorar a lavoura para verificar a ocorrência da doença desde o início do crescimento da soja; 5) aplicação de fungicidas protetores ou sistêmicos (Yorinori, 2004). Porém, a estratégia mais econômica e desejada de controle das ferrugens é a utilização de variedades resistentes. Recentemente, foram liberadas três cultivares comerciais de soja resistentes à *P. pachyrhizi*, BRSGO 7560, TMG 801 e TMG 803 (Godoy, dados não publicados).

Cinco locos gênicos denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* que conferem resistência à ferrugem asiática da soja já foram descritos (McLean & Byth, 1980; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia *et al.*, 2008), sendo que o loco *Rpp1* contém um alelo, *Rpp1b*, associado a resistência à *P. pachyrhizi* (Chakraborty *et al.*, 2009) e o loco *Rpp5* contém dois alelos dominantes e um recessivo de resistência (Garcia *et al.*, 2008). No entanto, a durabilidade dessa resistência no campo é duvidosa em função da variabilidade genética de *P. pachyrhizi* (Oliveira *et al.*, 2005), sendo recomendada a sua utilização associada à aplicação de fungicidas, o que daria maior estabilidade no controle da doença, em casos do retardamento da aplicação dos fungicidas.

2.2 – Efetores

2.2.1- Descoberta dos efetores

Diversos fitopatógenos, incluindo bactérias, fungos, oomicetos, e nematóides, secretam proteínas e outras moléculas para diferentes compartimentos celulares dos seus respectivos hospedeiros para modular o sistema de defesa da planta, possibilitando a colonização parasítica (Abramovitch *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2008; Chisholm *et al.*, 2006; Kamoun, 2006). Em resposta à infecção por patógenos, as plantas desenvolveram ao longo do processo evolutivo, um sistema imune com duas

linhas de defesa principais: a primeira é caracterizada por uma defesa basal que atua extracelularmente, isto é, antes da invasão da célula vegetal pelo patógeno. Baseia-se no reconhecimento de padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs) por proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática, que ativam a imunidade elicitada por PAMPs (PTI, *PAMP-triggered immunity*). Esta defesa basal previne uma posterior colonização do hospedeiro pelo fitopatógeno (De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006). Um dos PAMPs fúngicos mais comuns é a quitina, principal componente estrutural da parede celular de fungos, para os quais dois receptores do tipo LysM foram caracterizados em arroz e *Arabidopsis* (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007). A PTI é suplantada pelos patógenos por meio da translocação de efetores para o citoplasma vegetal, onde atuam inibindo as rotas de sinalização de PTI. Durante o processo de evolução, as plantas desenvolveram uma segunda linha de defesa baseada no reconhecimento direto ou indireto desses efetores pelas proteínas de resistência (R) e, a subsequente ativação da imunidade elicitada por efetores (ETI, *effector-triggered immunity*). Isto desencadeia uma resposta de defesa rápida e localizada, denominada de resposta de hipersensibilidade (HR), que restringe o desenvolvimento do patógeno no sítio inicial de infecção. Por seleção natural, na tentativa de suplantar ETI, patógenos responderam por meio da mutação ou perda de efetores ou desenvolveram novos efetores, enquanto que as plantas desenvolveram novas proteínas R para mediar o reconhecimento destes novos efetores (De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006).

Efetores são definidos como moléculas que alteram a estrutura e função dos componentes celulares do hospedeiro, facilitando a infecção (fatores de virulência ou toxinas) e/ou ativando respostas de defesa (fatores de avirulência ou elicitores) (Kamoun, 2009).

Sabe-se hoje, que os genes *Avr* codificam proteínas efetoras que são reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes *R*. A hipótese da relação gene-a-gene proposta por Flor (1942) relata, respectivamente, que para cada gene *Avr* no patógeno, há um gene *R* correspondente no hospedeiro, refletindo o fenótipo das interações patógeno-hospedeiro,

determinando a gama de plantas hospedeiras de um determinado patógeno (Dangl & McDowell, 2006).

A clonagem molecular do primeiro gene *Avr* bacteriano foi relatada em 1984 (Staskawicz *et al.*, 1984) enquanto o primeiro gene *Avr* fúngico foi clonado somente em 1991 (van Kan *et al.*, 1991) e, em 2004 foi clonado o primeiro gene *Avr* de um oomiceto (Tian *et al.*, 2004).

2.2.2 – Caracterização dos efetores

A caracterização de proteínas efetoras secretadas por bactérias fitopatogênicas e patogênicas de animais por meio de uma estrutura afunilada, denominada de sistema III de secreção, surgiu como uma estratégia para a compreensão dos mecanismos de virulência. Ficou determinado que esta estrutura produzida por sistemas de secreção encontrado em bactérias gram-negativas injeta efetores para dentro das células do hospedeiro (Collmer *et al.*, 2000; Kjemtrup *et al.*, 2000). Estes efetores bacterianos atingem diversos processos celulares, tais como transdução de sinal, transcrição e secreção de vesículas e, podem ser detectadas por proteínas de resistência intracelulares (Zou & Chai, 2008).

Determinados oomicetos, como *Phytophthora infestans*, secretam centenas de proteínas efetoras que atingem dois locais distintos no hospedeiro vegetal (Whisson *et al.*, 2007). Efetores apoplásticos são secretados na planta no espaço extracelular, enquanto que efetores citoplasmáticos são translocados para dentro da célula vegetal, onde atingem diferentes compartimentos subcelulares. Em contraste com efetores apoplásticos, conhecidos por inibir hidrolases do hospedeiro (Damasceno *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2004), as atividades bioquímicas dos efetores citoplasmáticos se mantêm não caracterizadas. Muitos efetores fúngicos identificados são oriundos de patógenos biotróficos e, os efetores que são reconhecidos por proteínas de resistência têm sido identificados apenas para fungos que formam haustórios.

Durante a emissão do haustório no interior da célula do hospedeiro ocorre a dissolução da parede celular, seguida da invaginação da membrana celular do hospedeiro, formando uma membrana extrahaustorial ao redor do haustório, sendo esta desprovida de parede celular (Mendgen & Hahn, 2002). O haustório mantém-se separado do citoplasma celular do hospedeiro, envolto pela parede celular haustorial, região conhecida como matriz extrahaustorial e pela membrana extrahaustorial (Fig. 3). Os haustórios constituem o principal sítio de absorção de nutrientes a partir do hospedeiro e há evidências de que os haustórios estejam envolvidos no redirecionamento do metabolismo vegetal e supressão da resposta de defesa do hospedeiro (Voegelé & Mendgen, 2003). A formação do haustório também induz mudanças estruturais na célula hospedeira como, por exemplo, rearranjo do citoesqueleto, migração do núcleo e condensação da cromatina (Mendgen & Hahn, 2002). Acredita-se que essas modificações são induzidas pela atuação de efetores, produzidos nos haustórios. Portanto, os haustórios constituem um local essencial para o estabelecimento de uma relação biotrófica de sucesso (Voegelé & Mendgen, 2003).

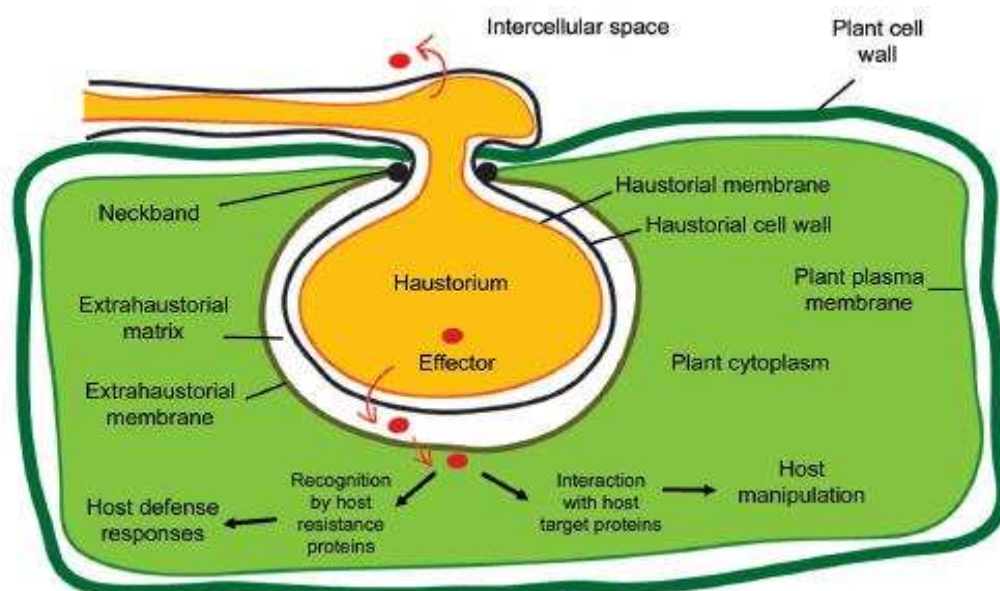


Figura 3. Interação haustório-hospedeiro. Efectores (pontos vermelhos) são secretados na matriz extrahaustorial, atravessam a matriz extrahaustorial, sendo translocados para o citoplasma vegetal, onde ou interagem com proteínas do hospedeiro, alterando o metabolismo vegetal. Ou são reconhecidos por proteínas

de resistência do hospedeiro, ativando respostas de defesa. Fonte: Dodds *et al.*, 2009.

Em células eucarióticas de determinados fungos e oomicetos, proteínas efetoras são exportadas por meio do sistema de secreção geral, também denominado de sistema de secreção do tipo II, mediado por sequências curtas de aminoácidos N-terminal conhecidas como peptídeos sinal (Rapoport, 1992; von Heijne, 1985).

Além dos efetores citoplasmáticos de oomicetos carregarem peptídeos sinal N-terminal, eles também contêm domínios conservados denominados RXLR-EER (Birch *et al.*, 2006; Kamoun, 2006). O domínio RXLR-EER é similar a um domínio envolvido na translocação de proteínas de *Plasmodium* spp. para dentro do citoplasma das células do hospedeiro (Marti *et al.*, 2004). Whisson *et al.* (2007) demonstraram que o domínio RXLR-EER não era requerido para a secreção do efector Avr3a do haustório de *P. infestans*, mas era necessário para translocação do efector do haustório para células infectadas de batata. Portanto, este domínio pode estar envolvido na translocação das proteínas efetoras para dentro das células vegetais (Grouffaud *et al.*, 2008; Whisson *et al.*, 2007).

Em contraste com oomicetos, os efetores de fungos hemibiotróficos e biotróficos compartilham pequenas similaridades com sequências presentes nos bancos de dados públicos. Eis algumas características em comum: podem ser ricos em cisteína, que proporciona a estabilidade da proteína em meio extracelular devido a formação de pontes de dissulfeto (Rep, 2005); não contêm o domínio RXLR-EER nem outros domínios conservados, apresentando sinal de secreção N-terminal (Catanzariti *et al.*, 2006), entretanto, há exceções, incluindo AVRa10 e AVRk1 de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Ridout *et al.*, 2006). Portanto, apesar de ter sido abordado em diferentes trabalhos que as proteínas Avr de patógenos biotróficos são secretadas através da membrana extrahaustorial, ainda permanece desconhecido o exato mecanismo envolvido na translocação dessas

proteínas para dentro das células dos hospedeiros vegetais (Dodds *et al.*, 2009).

Uma questão importante é se o processo de transferência de efetores depende de estrutura especializada de secreção do patógeno, análoga ao sistema de secreção tipo III de bactérias, ou se a transferência depende de uma maquinaria de transporte da célula. Uma confirmação forte da segunda hipótese efetivou-se em um estudo recente do efetor Avr1b em *Phytophthora sojae* por Dou *et al* (2008c), que demonstraram que o domínio RXLR-EER interpõe a transferência de Avr1b para dentro da célula vegetal na ausência do patógeno. A fusão da região do domínio RXLR-EER com Avr1b ao gene da proteína fluorescente verde (GFP) permitiu observar a proteína fluorescente entrar nas células da raiz da soja sem o patógeno. Este resultado sugere que os efetores translocados intracelularmente no hospedeiro não dependem de um mecanismo advindo do patógeno.

Em um outro trabalho, Catanzariti *et al.* (2006) demonstraram que a transferência da proteína efetora AvrM de *Melampsora lini* para dentro das células vegetais independe do patógeno, pois as formas secretadas desta proteína induzem a resposta de defesa do hospedeiro quando expressas transientemente por agroinfiltração em células vegetais de planta resistentes de linho. Efetores de ferrugens aparentam utilizar um mecanismo de transferência derivado de plantas, mas as comparações entre as sequências não identificaram domínios conservados claramente comuns a estas proteínas. A região N-terminal de AvrM é rica em aminoácidos positivamente carregados de arginina e lisina, que são comuns a diversos peptídeos de penetração em células (CPPs) que facilitam o transporte de proteínas através da membrana. Análises de mutações identificaram sequências curtas de CPP nas proteínas Tat do vírus tipo I que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em humanos (Frankel & Pablo, 1988), sendo detectadas que estas sequências medeiam a translocação intracelular. Diversos CPPs definidos em sistemas de mamíferos também mostraram ter funcionalidade em plantas (Chugh & Eudes, 2008).

A divergência aparente entre os sinais de transporte entre oomicetos e ferrugens, especialmente a forte conservação entre efetores de oomicetos e a falta de conservação entre efetores de ferrugens, possivelmente sugere que há diferentes mecanismos de transporte envolvidos. Entretanto, é possível que a evolução convergente tenha desencadeado mecanismos de transporte similares no hospedeiro por ambas as classes de patógenos sem deixar uma relação claramente reconhecível. Estudos ultraestruturais detectaram extensões tubulares na membrana extrahaustorial com vesículas gassociadas que adentraram o citoplasma celular do hospedeiro, formando um contato íntimo com o retículo endoplasmático e dictiossomos do hospedeiro (Mims *et al.*, 2002). Isto sugere que a endocitose pode ser um processo chave na translocação de proteínas efetoras.

Muitas das proteínas efetoras identificadas apresentam pouca similaridade com proteínas de funções conhecidas, portanto, há poucas pistas das suas funções na infecção. As evidências estão envolvidas particularmente na supressão da PTI. Bos *et al.* (2006) demonstraram que a proteína Avr3a de *P. infestans* em *Nicotiana benthamiana* inibe a resposta de morte celular induzida pelo elicitor INF1, também oriundo de *P. infestans*. Em 2007, Sohn *et al.* provaram que ATR1 e ATR13 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* suprimiram a resistência basal em *Arabidopsis*. Isto foi mostrado pela secreção destas proteínas pelo sistema tipo III da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e, posterior, translocação intracelular. A expressão destas proteínas ativou respostas de defesa nas plantas contendo os genes *R* correspondentes. A proteína ATR13 também suprimiu a deposição de calose induzida por PAMPs da bactéria, novamente sugerindo o papel na inibição da PTI. Dou *et al.* (2008a) atestaram que Avr1b de *P. sojae* pôde suprimir a morte celular induzida pela proteína de rato BAX, que é um regulador positivo de apoptose. Avr1b suprimiu a HR induzida por BAX em soja e *N. benthamiana*, assim como em levedura, sugerindo que os mecanismos de morte celular programada são comuns a diversos organismos. No trabalho de Kelley *et al.* (2010), utilizando a técnica de agroinfiltração, ficou demonstrado que a proteína SNE1 secretada por *P.*

infestans suprime a HR induzida pelos genes *PsojNIP* e *PinPP1.1*, sendo comprovado previamente que estes ativam as respostas de defesa da planta e causam a subsequente morte celular no tecido vegetal (Qutob *et al.*, 2002; Pemberton & Salmond, 2004; Kanneganti *et al.*, 2006). Também ficou demonstrado que a proteína SNE1 suprime a HR mediada pela interação das proteínas Avr/R de um amplo espectro de patossistemas, incluindo oomiceto (Avr3a/R3a), bactéria (AvrPto/Pto), fungo (Avr9/Cf9) e vírus (CP/Rx2). A partir destes resultados, a hipótese formulada foi de que as diferentes rotas de sinalização de defesa dos genes *R* convergem em um ponto comum que é suprimido pela proteína SNE1 (Kelley *et al.*, 2010).

Dentre os efetores de fungos translocados, dois apresentam funções preditas baseadas em similaridade de sequências. O efector AvrP123 de *M. lini* apresenta similaridade com inibidores de serino-proteases do tipo kazal, sugere um possível papel dessa proteína na patogênese por meio da inibição de proteases do hospedeiro (Catanzariti *et al.*, 2006), e AVR-Pita de *Magnaporthe oryzae* apresenta similaridade a uma metalopeptidase de *Aspergillus* spp. (Orbach *et al.*, 2000), que possuem papel importante em hidrolisar proteínas do hospedeiro (Tatsumi *et al.*, 1991). Entretanto, os alvos destas proteínas no hospedeiro não foram identificados. Além destes, outros efetores foram caracterizados como as proteínas Avr2 e Avr4 do fungo *Cladosporium fulvum*. O gene *Avr2* de *C. fulvum* gera uma proteína que induz HR em tomateiros que carregam o gene de resistência cognato *Cf-2* (Luderer *et al.*, 2002). Durante a infecção, a proteína Avr2 inibe pelo menos quatro cisteína proteases de tomate, contribuindo para a virulência do patógeno, por inibir proteases que são importantes para a resposta de defesa do tomateiro (Shabab *et al.*, 2008). O gene *Avr4* codifica uma proteína que tem semelhança estrutural a proteínas com um domínio de ligação a quitina de invertebrados (Shen & Jacobs-Lorena, 1999). A ligação da proteína Avr4 a quitina foi confirmada experimentalmente, e, além disso, foi demonstrado que Avr4 pode proteger fungos quitinosos, tal como *Trichoderma viride* e *Fusarium solani*, contra a ação de quitinases básicas vegetais (Van Den Burg *et al.*, 2006).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para caracterizar os secretomas de fungos e oomicetos fitopatogênicos. A técnica de hibridização subtrativa de populações de cDNA seguida da amplificação por PCR e clonagem dos genes diferencialmente expressos (SSH, ou *Subtractive Supressive Hybridization*) tem sido a técnica mais comumente usada para a identificação de genes expressos. Todavia, esta técnica tem sido pouco eficiente para produzir bibliotecas enriquecidas para genes do fungo expressos durante o processo infeccioso, devido à menor abundância de tecido fúngico em relação ao tecido vegetal e à expressiva reprogramação de expressão gênica que ocorre na planta em resposta à infecção por patógeno (Diatchenko *et al.*, 1996). No caso das ferrugens, tem-se obtido maior sucesso com a construção deste tipo de biblioteca a partir de mRNA extraído de haustórios purificados do tecido infectado por meio de cromatografia de afinidade com concanavalina A (Cantazariti, *et al.*, 2006). Para a ferrugem da soja, uma biblioteca de cDNA foi construída a partir de mRNA isolado de urédias de folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi* por meio da microdisseção a laser a fim de reduzir o número de ESTs de plantas versus os ESTs fúngicos (Tremblay *et al.*, 2009).

Outra estratégia utilizada para caracterizar os secretomas de fungos e oomicetos fitopatogênicos explora algoritmos biocomputacionais para inferir peptídeos sinal N-terminal em proteínas preditas de sequências genômicas ou de ESTs, e foi utilizada para identificar proteínas secretadas do oomiceto *P. infestans* (Tian *et al.*, 2004; Torto *et al.*, 2003), do fungo *M. lini* da ferrugem do linho (Catanzariti *et al.*, 2006), e do fungo *M. grisea* da brusone do arroz (Dean *et al.*, 2005).

Em contraste à estratégia *in silico*, a estratégia do sistema YST (*yeast secretion trap*), desenvolvido por Jacobs (1997), é um método promissor para identificação de proteínas fúngicas secretadas, utilizando o sistema de secreção em leveduras. No trabalho de Lee *et al.* (2006) este novo sistema foi utilizado para estudar a interação *Solanum lycopersicum* - *P. infestans*, sendo identificados 45 YST cDNAs. Destes, 23 foram de origem fúngica. Foram identificados genes com alta similaridade com genes que codificam

proteínas conhecidamente secretadas: *PiE1* que foi similar a um efector envolvido na resposta de hipersensibilidade; *PiE17* foi similar a um gene que codifica uma metalopeptidase; *PiE18*, similar a um gene que codifica cutinase. Metalopeptidase e cutinase são enzimas hidrolíticas comumente secretadas por fitopatógenos e determinantes da patogenicidade. Dos genes de origem vegetal, aproximadamente 50% codificam proteínas com similaridade a proteínas envolvidas na resposta de defesa da planta, incluindo proteínas PR (*Pathogenesis-related proteins*).

Link & Voegelé (2008) identificaram possíveis genes de patogenicidade do fungo *Uromyces fabae*, utilizando o sistema YST. Foram descritos 62 genes que codificam proteínas secretadas pelo haustório e 42 genes que codificam proteínas secretadas em esporos germinados. Quatro destes genes eram idênticos em ambas as bibliotecas, indicando uma forte regulação fase específica na secreção de proteínas. Foi observada similaridade com proteínas de bancos de dados públicos para 39 das seqüências analisadas, 28 das quais apresentaram similaridade com proteínas identificadas apenas entre os membros da ordem Uredinales, uma indicação de possíveis papéis na virulência e especificidade de hospedeiro exclusivo para Uredinales.

Em outros trabalhos que buscavam identificar possíveis genes de patogenicidade, os genes *Avr*, a técnica utilizada foi a expressão transiente em plantas mediado pela agroinfiltração. Van der Hoorn *et al.* (2000) demonstraram que as proteínas efectoras *Avr9* e *Avr4* de *C. fulvum* quando agroinfiltradas em folhas de tabaco transgênicas contendo, respectivamente, os genes de resistência *Cf9* e *Cf4* desencadeiam a HR. A expressão transiente do gene da β -glucuronidase (*gus*) serviu como indicativo da eficiência da transformação da planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Vancanneyt *et al.*, 1990). Recentemente, proteínas secretadas por *P. pachyrhizi* foram identificadas por meio da utilização do sistema *Yeast Signal Trap* proposto por Lee *et al.* (2006) (Brommonschenkel *et al.*, 2009). No entanto, não há estudos envolvendo a caracterização dos genes *Avr*

deste fungo e a expressão transiente destes genes em plantas hospedeiras e não hospedeiras.

CAPÍTULO 1

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Glycine max* AO ISOLADO MONOPUSTULAR PPUFV02 DE *Phakopsora pachyrhizi*

RESUMO

COSTA, Poliene Martins. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Reação de genótipos de *Glycine max* ao isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi*.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Marisa Vieira de Queiroz.

A ferrugem asiática da soja (FAS), causada por *Phakopsora pachyrhizi* é a principal doença da cultura. Atualmente, há três cultivares comerciais de soja resistentes à *P. pachyrhizi*, BRSGO 7560, TMG 801 e TMG 803. Cinco locos gênicos denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* que conferem resistência à FAS já foram descritos (McLean & Byth, 1980; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia *et al.*, 2008), sendo que o loco *Rpp1* contém um alelo, *Rpp1b*, associado a resistência à FAS (Chakraborty *et al.*, 2009) e o loco *Rpp5* contém dois alelos dominantes e um recessivo de resistência (Garcia *et al.*, 2008). O presente trabalho teve por objetivo avaliar e caracterizar a reação de 33 genótipos de soja ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, visando subsidiar futuros estudos de clonagem e caracterização de genes de avirulência deste patógeno. Este isolado foi avirulento nos genótipos de soja PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487 e PI 471904 que contêm, respectivamente, os genes de resistência *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp4*, *Rpp5*. A resistência desses genótipos se manifestou na forma de lesões tipo RB. Foi verificado também a ocorrência de lesões tipo RB nos genótipos de soja PI 587880-A, PI 594767-A, PI 561356, PI 587905 e ausência de sintomas no genótipo PI 594754 após a inoculação com o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. Em conclusão, este isolado provavelmente apresenta genes *Avr*

correspondentes aos genes *R* presentes nos genótipos de soja mencionados. A futura expressão transiente de genes que codificam proteínas secretadas nesses genótipos poderá permitir a identificação de genes de avirulência do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*.

1-INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática, causada por *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), é considerada a doença foliar mais destrutiva da cultura da soja no Brasil (Yorinori *et al.*, 2005). *P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico pertencente ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae (Goellner *et al.*, 2010). Esse fungo forma uredósporos em urédias de cinco a oito dias após inoculação sobre folhas de plantas suscetíveis. Os uredósporos são liberados da urédia e dispersos pelo vento (Goellner *et al.*, 2010). O processo de infecção dos uredósporos de *P. pachyrhizi* compreende diversas etapas: adesão na superfície do hospedeiro, germinação, formação do apressório, penetração através da cutícula, invasão e crescimento das hifas no tecido do hospedeiro (Koch *et al.*, 1983). Aos oito dias após a penetração, é possível visualizar as urédias, principalmente na face abaxial das folhas e finalmente a liberação dos uredósporos (Koch & Hoppe, 1987).

Além da soja, *P. pachyrhizi* é capaz de infectar mais de 60 espécies em pelo menos 26 gêneros de plantas leguminosas (Ono *et al.*, 1992). Bromfield (1984) aponta três tipos de reações decorrentes da infecção de *P. pachyrhizi* em plantas hospedeiras: TAN (lesões castanho clara), RB (lesões castanho escuro) e imunidade. A lesão TAN contém urédias esporulantes e reflete a suscetibilidade do hospedeiro, enquanto que em cultivares resistentes se observa as lesões RB com pouca ou nenhuma esporulação. A reação de imunidade se caracteriza pela ausência de sintomas macroscópicos da doença nas folhas do hospedeiro.

A utilização de variedades resistentes é a medida de controle mais desejada da ferrugem asiática da soja (FAS). Cinco locos gênicos denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* que conferem resistência à FAS já foram descritos (McLean & Byth, 1980; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia *et al.*, 2008), sendo que o loco *Rpp1* contém um alelo, *Rpp1b*, associado a resistência à FAS (Chakraborty *et al.*, 2009) e o loco *Rpp5* contém dois alelos dominantes e

um recessivo de resistência (Garcia *et al.*, 2008). Recentemente, foram liberadas três cultivares comerciais de soja resistentes à *P. pachyrhizi*, BRSGO 7560, TMG 801 e TMG 803 (Godoy, dados não publicados). No entanto, a durabilidade dessa resistência no campo é duvidosa em função da variabilidade genética de *P. pachyrhizi* (Oliveira *et al.*, 2005). Além disso, o plantio em larga escala de variedades resistentes normalmente leva a seleção de raças virulentas do patógeno. As raças virulentas do fitopatógeno possuem mutações nos genes *Avr* que são genes que codificam proteínas efetoras reconhecidas direta ou indiretamente pelas proteínas codificadas pelos genes *R*, em uma relação gene-a-gene, inicialmente descrita por Flor (1942), no patossistema ferrugem do linho-linho (Jones & Dangl, 2006). Os efetores codificados pelos genes *Avr* desempenham um papel fundamental no fenótipo das interações patógeno-hospedeiro, determinando a gama de plantas hospedeiras de um determinado patógeno (Dangl & McDowell, 2006).

Sabe-se que os genes de avirulência codificam proteínas secretadas que são reconhecidas por proteínas R localizadas na membrana plasmática ou no citoplasma do hospedeiro (Jones & Dangl, 2006). Embora diversos genes de resistência tenham sido descritos em soja, os genes de avirulência correspondentes de *P. pachyrhizi* ainda não foram identificados e caracterizados. Sabe-se, porém, que as sequências das proteínas codificadas pelos genes *Avr* são secretadas no apoplasto e/ou translocadas para o citoplasma da célula vegetal (Whisson *et al.*, 2007). Desta forma, a caracterização do secretoma de *P. pachyrhizi* é etapa primordial para identificação de genes candidatos a genes *Avr*. Trabalhos pioneiros de caracterização do secretoma do isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foram iniciados por Brommonschenkel *et al.* (2009). Utilizando o sistema *Yeast Secretion Trap*, esses autores identificaram vários genes do isolado PPUFV02 que codificam proteínas secretadas. Todavia, dada a especificidade genética das interações patógeno-hospedeiro torna-se de fundamental importância o conhecimento da reação dos genótipos de soja que contenham diferentes genes de resistência a este isolado. Desta forma,

esse estudo teve como objetivo avaliar e caracterizar a reação de 33 genótipos de soja ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, visando subsidiar futuros estudos funcionais direcionados à identificação de genes *Avr*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção e multiplicação do isolado monopustular PPUFV02

O isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foi obtido a partir de uma única pústula com uredósporos obtidos de folhas de soja com sintomas de ferrugens de soja coletadas em 2008, no Campo Experimental da Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. Uredósporos deste isolado foram coletados por aspiração utilizando uma bomba a vácuo, armazenados a -80°C, e multiplicados em soja cultivar Conquista, em condições de casa de vegetação.

2.2- Material vegetal, cultivo das plantas e inoculação

Foram avaliados 33 genótipos de soja quanto à resistência ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* (Tabela 1), sendo que oito genótipos possuem genes de resistência (*R*) já caracterizados. As sementes desses genótipos foram pré-germinadas, para que a emergência fosse homogênea, e então as plântulas foram plantadas em vasos plásticos com capacidade para dois litros, contendo solo misturado com areia e esterco na proporção 3:1:1, previamente tratado com brometo de metila, que foram mantidos em casa de vegetação.

A inoculação foi realizada aos 30 dias após o plantio das sementes de soja. As plantas inoculadas encontravam-se em diferentes estádios de desenvolvimento, conforme o genótipo (Tabela 1). As plantas foram inoculadas com uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ uredósporos/mL do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* em água destilada + Tween 20 (0,01%), e mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C no escuro, durante 24h sendo, posteriormente, transferidas para a casa de vegetação, onde permaneceram

durante todo o período de avaliação. Plantas de soja do cultivar suscetível Conquista foram utilizadas como testemunha em todos os ensaios. Os ensaios foram montados com três repetições, sendo cada repetição representada por uma planta.

Tabela 1. Genótipos de soja inoculados com o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* com os respectivos genes de resistência e estádios de desenvolvimento à época da inoculação.

Genótipo	Gene R	Estádio Fenológico
Conquista	-	V5
BRS184	-	V5
Abura	-	R6
Nova Santa Rosa	-	V5
Brasdo-11610	-	V4
Williams82	-	V4
BR01-18437	-	V5
PI 200492	<i>Rpp1</i>	R5
PI 594538-A	<i>Rpp1b</i>	R5
PI 230970	<i>Rpp2</i>	V4
PI 462312	<i>Rpp3</i>	V4
PI 459025	<i>Rpp4</i>	V5
PI 200526	<i>Rpp5</i>	V5
PI 200487 (Kinoshita)	<i>Rpp5</i>	R5
PI 471904	<i>Rpp5</i>	R5
PI 587886	-	R5
PI 594767-A	-	R6
PI 561356	-	R5
PI 587880-A	-	V6
PI 587905	-	R5
PI 594754	-	R7
PI 379618TC1	-	V5
PI 416819	-	R5
Hyunga	-	R5
Shiranui	-	R5
PI 200455	-	R5
GC 84051-9-1	-	V5
GC 84051-18-4	-	R5
GC 84051-21-4	-	R5
PI 416764	-	V5
PI 423956	-	V6
TMG 801 "INOX"	-	V5
TMG 803 "INOX"	-	V4

Gene R – gene de resistência descrito; Estádio fenológico – estágio fenológico observado no dia da inoculação da soja pelo isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, segundo Herman (1997).

2.3- Avaliação da resistência ao isolado monopustular de *P. pachyrhizi*

As avaliações foram realizadas aos seis, nove e 14 dias após a inoculação (dpi). Avaliou-se a ocorrência e sintomas da doença e o tipo da lesão presente, RB ou TAN. A severidade da ferrugem foi avaliada visualmente no folíolo central do terceiro trifólio de cada planta com o auxílio da escala diagramática, conforme proposto por Godoy *et al.* (2006).

Fragmentos foliares de aproximadamente 1 cm² apresentando sintomas foram coletados aos 14dpi, visando a avaliação microscópica das lesões. Os fragmentos foram colocados em tubos de centrífuga de 15mL contendo uma solução de etanol + ácido acético glacial na proporção de 3:1 para diafanização. A solução foi trocada até a remoção total da clorofila. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para uma solução de lactofenol por pelo menos 24h e, posteriormente corados em solução de lactofenol + azul de algodão 0,1% e, montados em lâminas para o exame ao microscópio óptico. Em cada fragmento, foi avaliado o tipo de lesão e a ausência ou presença de urédias nas lesões.

3- RESULTADOS

Os primeiros sintomas, caracterizadas como lesões castanhas, foram observados na face abaxial das folhas aos seis dias após a inoculação (dpi), sendo que aos 14 dpi, foi possível classificar os tipos de lesões em praticamente todos os genótipos. Em 12 deles, não foi possível diferenciar lesões TAN e RB, denominadas lesões ND (não determinadas). Aos 14dpi, observou-se a formação de pequenos “flecks”, pontuações cloróticas, nos últimos trifólios inoculados quando estes eram visualizados contra a luz (Tabela 2).

Além do genótipo suscetível Conquista utilizado como testemunha, nove dos 33 genótipos analisados, apresentaram reações TAN, típica da interação suscetível, aos 14dpi (Tabela 2). Dentre os nove, destacam-se os genótipos PI 200492, PI 462312 e PI 200526 que contêm os genes de resistência *Rpp1*, *Rpp3* e *Rpp5*, respectivamente. No PI 587886, foram observadas tanto plantas com lesões TAN quanto plantas com lesões RB. Dos 22 genótipos restantes, nove produziram lesões RB e, destes quatro com lesões “fleck”. Apenas o genótipo PI 594754 apresentou o fenótipo de imunidade, também formando “fleck” (Tabela 2).

A severidade da ferrugem da soja quantificada na face adaxial das folhas aos 14dpi variou de 2 a 78,5% nos genótipos PI 594754 e Conquista, respectivamente. Enquanto que nos genótipos com lesões do tipo TAN, a severidade variou de 42 a 78,5%, nos genótipos com lesões RB a variação foi de 18 a 42%. O acesso PI 594754 com reação imune apresentou a menor severidade, 2% (Tabela 2). Os detalhes e a severidade dos diferentes genótipos de soja estão ilustrados nas figuras (1 a 4).

Tabela 2. Severidade da ferrugem da soja e tipo de lesão observados nos diferentes genótipos aos 14 dias após a inoculação com $1,0 \times 10^5$ uredósporos/mL do isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*.

Genótipos da soja	Nº de plantas	Média da severidade	Tipo de lesão	Observação
	avaliadas	da ferrugem		
Conquista	3	78.5	TAN	
BRS 184	3	42	TAN	
Abura	3	42	TAN	
Nova Santa Rosa	3	42	TAN	
Brasdoe 11610	3	42	TAN	
Williams 82	3	42	TAN	
BR01-18437	3	42	TAN	
PI 200492 (<i>Rpp1</i>)	3	42	TAN	
PI 594538-A (<i>Rpp1b</i>)	3	7	RB*	Fleck
PI 230970 (<i>Rpp2</i>)	3	42	RB	
PI 462312 (<i>Rpp3</i>)	3	42	TAN	
PI 459025 (<i>Rpp4</i>)	3	42	RB	
PI 200526 (<i>Rpp5</i>)	3	42	TAN	
PI 200487 (<i>Rpp5</i>)	3	42	RB	
PI 471904 (<i>Rpp5</i>)	3	42	RB	
PI 587886	2	18	TAN/RB	
PI 594767-A	3	42	RB*	Fleck
PI 561356	3	18	RB	
PI 587880-A	2	18	RB*	Fleck
PI 587905	3	18	RB*	Fleck
PI 594754	3	2	imune	Fleck
PI 379618TC1	3	42	ND	
PI 416819	3	42	ND	
Hyunga	3	42	ND	
Shiranui	3	42	ND	
PI 200455	3	42	ND	
GC 84051-9-1	3	42	ND	
GC 84058-18-4	3	42	ND	
GC 84051-21-4	3	42	ND	
PI 416764	2	18	ND	
PI 423956	3	42	ND	
TMG 801 INOX	3	18	ND	
TMG 803 INOX	1	42	ND	

TAN: lesões “tannish”; RB: lesões “redish-brown”; ND: lesões não determinadas; *lesões RB com manchas “fleck”.

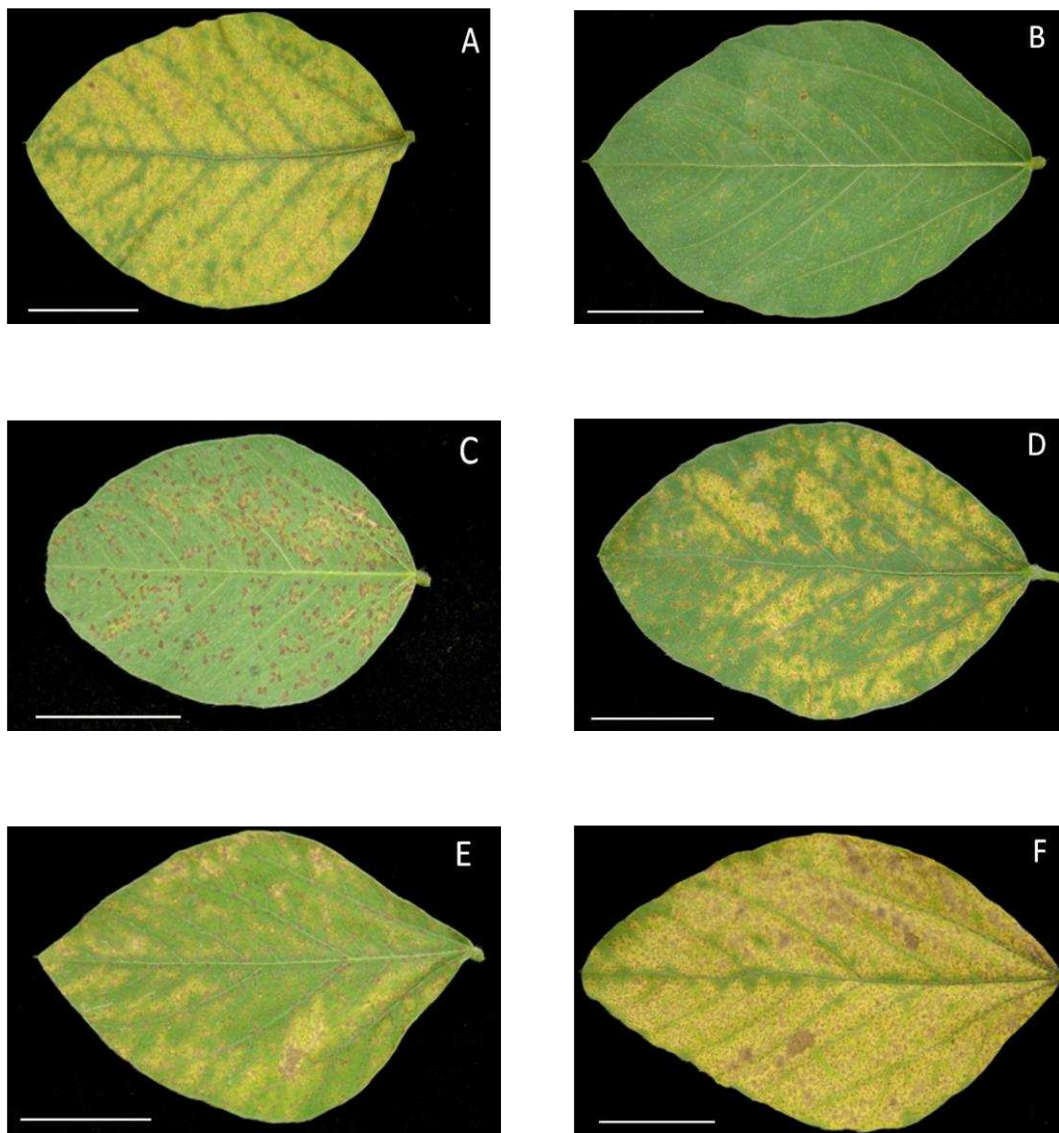


Figura 1. Reação de diferentes genótipos de soja ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* visualizada aos 14 dias após a inoculação. A. PI 200492 (*Rpp1*). B. PI 594538-A (*Rpp1b*). C. PI 230970 (*Rpp2*). D. PI 462312 (*Rpp3*). E. PI 459025 (*Rpp4*). F. Testemunha – cultivar Conquista. Barra= 2 cm.

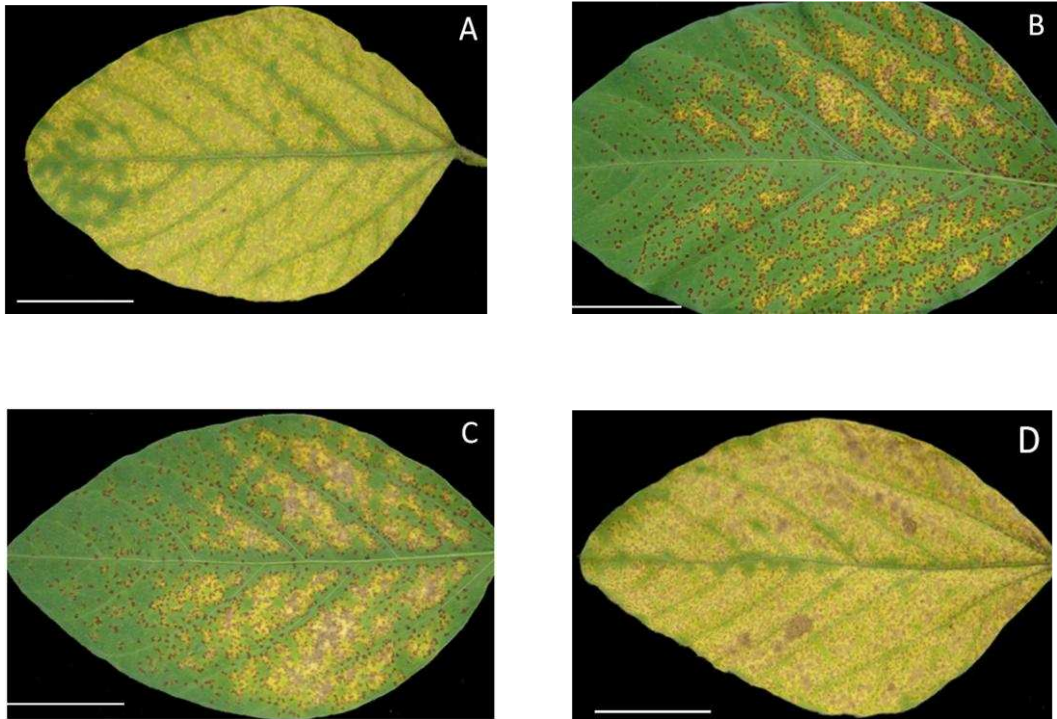


Figura 2. Reação de diferentes genótipos de soja ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* visualizada aos 14 dias após a inoculação. A. PI 200526 (*Rpp5*). B. PI 200487 (*Rpp5*). C. PI 471904 (*Rpp5*). D. Testemunha – cultivar Conquista. Barra= 2 cm.

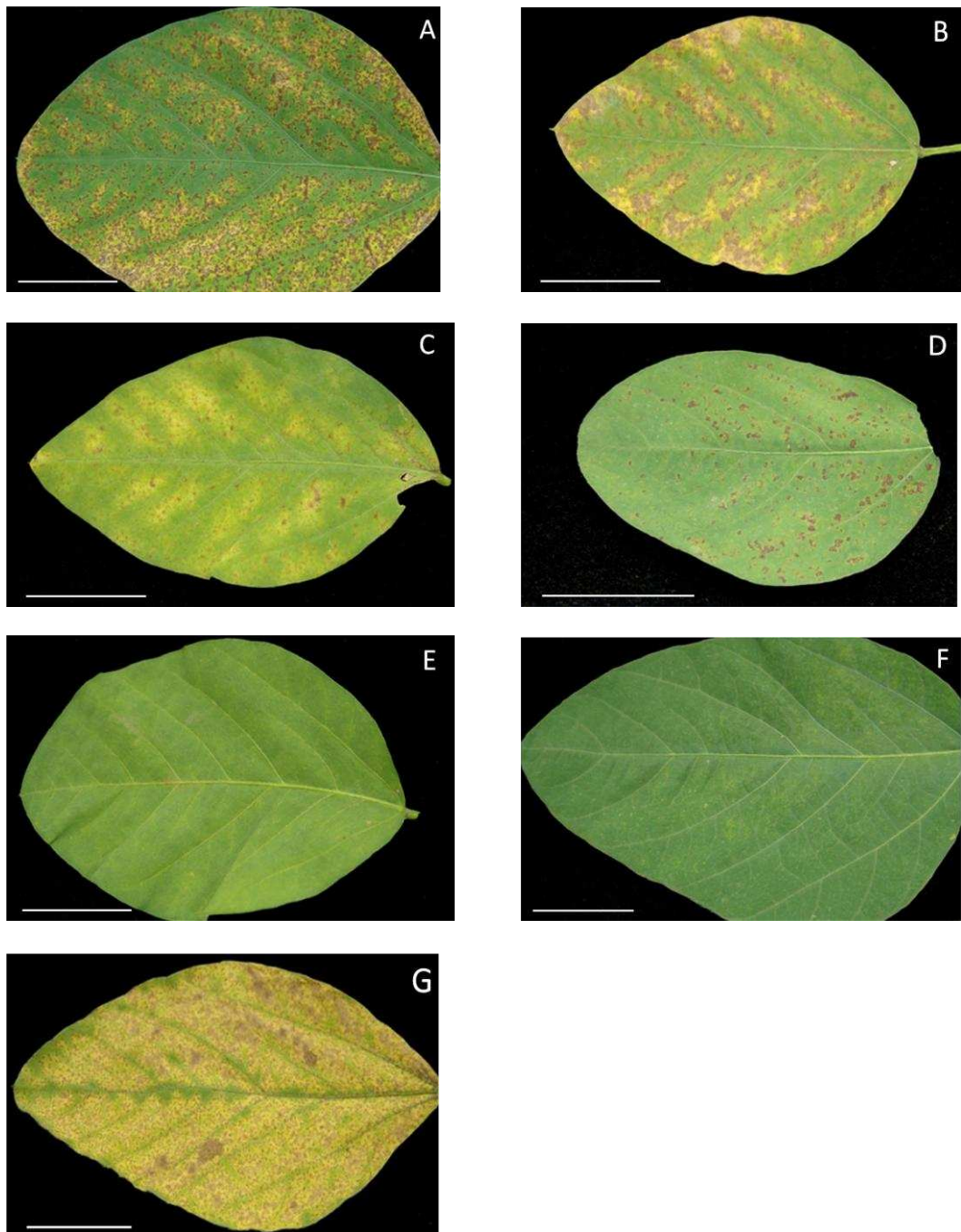


Figura 3. Reação de diferentes genótipos de soja ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* visualizada aos 14 dias após a inoculação. A. PI 594767-A. B. PI 561356. C. PI 587880-A. D. PI 587905. E. PI 594754. F. PI 594754 com manchas “fleck”. G. Testemunha – cultivar Conquista. Barra= 2 cm.

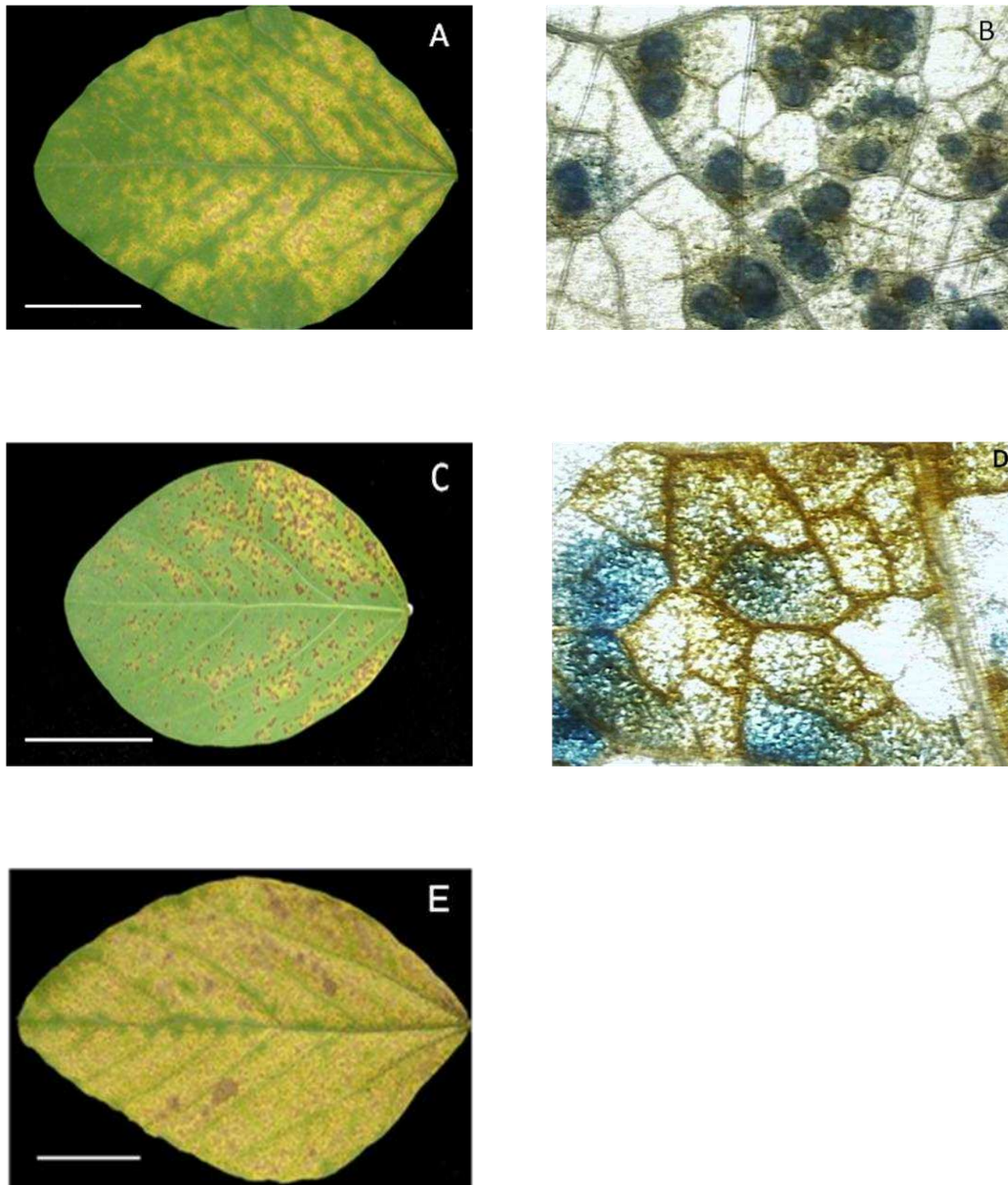


Figura 4. Reações diferentes observadas em plantas do genótipo PI 587886 inoculadas com o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* visualizadas aos 14 dias após a inoculação. A. Folha com lesão tipo TAN. B. Presença de urédias na lesão tipo TAN. C. Folha com lesão tipo RB. D. Ausência de urédias na lesão tipo RB. E. Testemunha – cultivar Conquista. Barra= 2 cm.

4- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* tem sido utilizado como isolado padrão no laboratório de genômica da UFV para estudos genômicos visando a identificação de efetores reconhecidos por proteínas codificadas por genes *R* nos genótipos correspondentes de soja, de acordo com a teoria gene-a-gene de Flor (1942). Este isolado foi avirulento nos cinco genótipos de soja PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487 e PI 471904 contendo os genes de resistência e nos PI 587880-A, PI 594767- A, PI 561356, PI 587905 que apresentaram lesões RB, assim como no genótipo PI 594754, caracterizado como imune.

A reação de suscetibilidade (lesões TAN) apresentada por 10 genótipos, incluindo os cultivares Conquista (utilizado como testemunha), Williams 82, PI 200492 (*Rpp1*) e PI 462312 (*Rpp3*) corroboram os resultados observados, respectivamente, por Li (2009), Laperuta *et al.* (2008) e Pham *et al.* (2010). Desde que houve a suplantação da resistência dos genes *Rpp1* e *Rpp3* por uma população de ferrugem da soja em 2003 no Brasil, relata-se, na literatura, a prevalência de suscetibilidade desses genótipos a isolados brasileiros de *P. pachyrhizi* (Calvo *et al.*, 2008), em contraste com a resposta de resistência conferida pelos genótipos PI 200492 (*Rpp1*) e PI 462312 (*Rpp3*) quando inoculados com os isolados de *P. pachyrhizi* nos Estados Unidos (Hartman *et al.*, 2005). No genótipo PI 200526 (*Rpp5*), foram observadas lesões TAN, diferentemente do genótipo PI 200487 (*Rpp5*), que apresentou lesões do tipo RB. Em um estudo de mapeamento genético na soja com marcadores SSR (*simple sequence repeat*), Garcia *et al.* (2008) comprovaram que embora o gene *Rpp5* tenha sido mapeado no mesmo loco em ambos os genótipos, PI 200526 e PI 200487, provavelmente, trata-se de alelos diferentes, justificando as diferentes respostas ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*.

A reação de resistência (lesões RB) produzida por nove genótipos de soja, inclui quatro genótipos cujos genes de resistência à *P. pachyrhizi* foram descritos. Pham *et al.* (2009) observaram que 90% das plantas PI 230970

(*Rpp2*) e 100% das plantas PI 459025 (*Rpp4*) produziram lesões RB aos 14 dias após inoculação com 10 isolados de *P. pachyrhizi*. A reação de resistência apresentada pelos genótipos PI 471904 (*Rpp5*) e PI 200487 (*Rpp5*) é validada pelos resultados observados por Koga *et al.* (2008). As lesões observadas nos acessos PI 594767-A, PI 587880-A, PI 587905 comprovam, respectivamente, os resultados avaliados por Li (2009), Miles *et al.* (2008) e Pham *et al.* (2009). Quanto ao genótipo PI 594538-A, que apresentou a resposta de resistência, foi observado por Twizeyimana *et al.* (2008) a reação de HR, visível macroscopicamente como pequenas manchas “fleck”. O resultado do acesso PI 561356 contradiz com as avaliações feitas por Miles *et al.* (2006), cujas lesões observadas foram TAN (primeira avaliação) e mistas (segunda avaliação). Esta divergência de respostas justifica-se, provavelmente, pela inoculação das plantas de soja no trabalho de Miles *et al.* (2006) por uma mistura de quatro isolados de *P. pachyrhizi*. O fenótipo de imunidade apresentado pelo genótipo PI 594754 corrobora com o resultado apresentado por Pham *et al.* (2009), no entanto dos 10 isolados de *P. pachyrhizi* inoculados separadamente neste acesso, apenas o isolado IN 73-1 (India) produziu a resposta de imunidade, enquanto que o restante dos isolados produziu a lesão RB.

O genótipo identificado como imune PI 594754 e com a menor severidade (2%) apresentou poucas lesões necróticas, provavelmente, pelo acúmulo de esporos do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* em um determinado local na folha. O genótipo PI 594538-A também com baixa severidade da doença, teve o alelo que confere o tipo de lesão RB mapeado na mesma região no LG-G do gene *Rpp1* (Hyten *et al.*, 2007). Chakraborty *et al.* (2009) relatam que este novo alelo, *Rpp1-b*, está localizado em um novo loco de resistência proximalmente ligado ao *Rpp1*. Este genótipo PI 594538-A (*Rpp1-b*) apresentou reação diferente à infecção pelo isolado monopustular PPUFV-02 quando comparado ao genótipo PI 200492 (*Rpp1*), cuja reação foi de suscetibilidade à *P. pachyrhizi*. O genótipo PI 587880-A também apresentou baixa severidade da ferrugem associado com lesões RB. Ray *et al.* (2009) utilizaram marcadores moleculares para o

mapeamento do alelo de resistência deste genótipo PI 587880-A e do acesso PI 587886 e verificaram que o gene localizava-se próximo ao alelo *Rpp1* (Hyten *et al.*, 2007). No trabalho de Ray *et al.* (2009), a reação destes dois genótipos à inoculação com vários isolados de *P. pachyrhizi* foi similar à reação observada por Chakraborty *et al.* (2009) no genótipo PI 594538-A. Ray *et al.* (2009) concluíram que os genes de resistência conferidos pelos genótipos PI 587886 e PI 587880-A representam o gene *Rpp1b* ou um outro gene proximamente ligado no mesmo loco gênico. No acesso 587886, no presente trabalho, foram avaliadas plantas tanto com lesões TAN quanto RB. Provavelmente, o material avaliado é constituído de mistura de linhagens resistentes e suscetíveis.

Quanto aos genótipos com genes de resistência descritos, PI 230970 (*Rpp2*), PI 459025 (*Rpp4*), PI 200487 (*Rpp5*) e PI 471904 (*Rpp5*) apresentaram lesões RB típicas, porém, a severidade de todos os quatro genótipos foram relativamente altas (42%), assim como nos PI 594767- A, PI 561356, PI 587905. Estas respostas representam um tipo de resistência manifestada tardiamente. Koga *et al.* (2008) sugerem que estes fenótipos caracterizam o segundo mecanismo de defesa ativado pelas plantas (conferido pelos genes *R*), isto é, imunidade ativada por efetores.

Pode-se concluir pelos resultados obtidos que o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foi avirulento nos genótipos de soja PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487 e PI 471904 que contêm, respectivamente, os genes de resistência *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp4*, *Rpp5*. A resistência desses genótipos se manifestou na forma de lesões tipo RB. Foi verificado também a ocorrência de lesões tipo RB nos genótipos de soja PI 587880-A, PI 594767-A, PI 561356, PI 587905 e ausência de sintomas no genótipo PI 594754. Em conclusão, este isolado provavelmente apresenta genes *Avr* correspondentes aos genes *R* presentes nos genótipos de soja mencionados. A futura expressão transiente de genes que codificam proteínas secretadas nesses genótipos poderá permitir a identificação de genes de avirulência do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES DE *Phakopsora pachyrhizi* QUE CODIFICAM PROTEÍNAS SECRETADAS

RESUMO

COSTA, Poliene Martins. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Caracterização e expressão transiente de genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas**. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Marisa Vieira de Queiroz.

Os fungos causadores de ferrugens secretam proteínas efetoras durante a sua interação com os hospedeiros. Essas proteínas estão relacionadas com a modificação da estrutura ou função dos componentes celulares do hospedeiro, influenciando na agressividade e virulência dos fungos e na resposta imune da planta. O presente trabalho teve por objetivo obter a seqüência completa e efetuar a expressão transiente em tabaco de seis genes do isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas durante a sua interação com a soja. Foram obtidas as seqüências completas de seis genes que codificam proteínas secretadas com características típicas de efetores, ou seja, são proteínas de função desconhecida, pequenas (<400 aa), com peptídeo sinal de secreção na região N-terminal e algumas delas com resíduos de cisteína capazes de formar pontes de dissulfeto. Estudos preliminares de agroinfiltração em tabaco revelaram que três genes, RSP_PAPH_05, RSP_PAPH_06 e RSP_PAPH_07, codificam proteínas capazes de induzir necrose em tabaco. Esse resultado é consistente com o mecanismo de patogênese de *P. pachyrhizi*. Todavia, estudos adicionais são necessários para confirmar os resultados obtidos em tabaco e para verificar se os mesmos resultados são obtidos em outras plantas não hospedeiras e em soja.

1-INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja é uma das doenças mais severas que incide na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. O fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), agente etiológico dessa doença pertence ao gênero *Phakopsora*, filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae (Goellner *et al.*, 2010).

Durante a sua interação com os hospedeiros, os fungos causadores de ferrugens secretam e translocam proteínas para o citoplasma da célula vegetal. Estas proteínas por estarem relacionadas com a modificação da estrutura ou função dos componentes celulares do hospedeiro, e influenciarem na agressividade e virulência dos fungos e resposta imune da planta, são denominadas proteínas efetoras (Mendgen & Hahn, 2002). Sabe-se hoje, que os genes *Avr* codificam proteínas efetoras que são reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes *R*. Este reconhecimento desencadeia várias cascatas de transdução de sinais que resultam na contenção do patógeno no sítio inicial de infecção, muitas vezes pela ativação da reação de hipersensibilidade (HR) (Jones & Dangl, 2006).

Diversos genes de resistência foram descritos em soja. No entanto, os genes de avirulência correspondentes de *P. pachyrhizi* ainda não foram identificados e caracterizados pela dificuldade de se efetuar estudos genéticos nesse patógeno e também pela ausência de um sistema de transformação genética desse fungo. Assim, estratégias de expressão temporária de genes candidatos em genótipos resistentes desponta como a principal alternativa para a identificação de genes de avirulência desse patógeno.

A técnica de expressão transiente de genes é uma poderosa ferramenta para analisar a função de genes e a interação entre genes de resistência de hospedeiros e genes de avirulência de patógenos (Frederick *et al.*, 1998; Kapila *et al.*, 1997; Scofield *et al.*, 1996). Os métodos de expressão transiente em plantas incluem a infiltração de espécies de *Agrobacterium* em tecidos vegetais (Janssen & Gardner, 1990), translocação

do DNA para o interior de células vegetais mediado por bombardeamento (Sanford *et al.*, 1993), introdução de cassetes de expressão para o interior de protoplastos de planta por eletroporação (Guerche *et al.*, 1987), e a inoculação de plantas com vírus recombinantes (Scholthof *et al.*, 1996). A expressão transiente demanda menos tempo para obtenção dos resultados e, geralmente, é de baixo custo comparada à transformação estável. O método de agroinfiltração tem sido utilizado com sucesso para ilustrar a função de genes *Avr* de diversos organismos, incluindo *Tobacco mosaic virus* (Erickson *et al.*, 1999), *Cladosporium fulvum* (Van der Hoorn *et al.*, 2000) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Tang *et al.*, 1996). Além disto, uma característica particular deste método é que ele apresenta funcionalidade em uma extensa variedade de espécies de plantas, tais como tabaco, batata, tomate, alface, ervilha, uva, e *Arabidopsis* (Mestre *et al.*, 2000; Santos- Rosa *et al.*, 2008; Van der Hoorn *et al.*, 2000; Wroblewski *et al.*, 2005).

Além da técnica de expressão transiente de genes, a caracterização do secretoma de *P. pachyrhizi* é etapa primordial para identificação de genes candidatos a genes *Avr*, pois os genes de avirulência codificam proteínas secretadas que são reconhecidas por proteínas R localizadas na membrana plasmática ou no citoplasma do hospedeiro (Jones & Dangl, 2006). Trabalhos pioneiros de caracterização do secretoma do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foram iniciados por Brommonschenkel *et al.* (2009). Utilizando o sistema *Yeast Secretion Trap*, esses autores identificaram vários genes do isolado PPUFV02 que codificam proteínas secretadas. Dando continuidade à caracterização do secretoma deste isolado, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção da sequência completa, caracterização e expressão transiente em tabaco dos seis genes do isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Obtenção da sequência completa dos genes selecionados

Selecionaram seis clones provenientes de sequências da biblioteca de cDNA da interação *Phakopsora pachyrhizi* – soja a partir do trabalho de Zaramela, 2009. Estes clones apresentavam sequências incompletas de cDNA em função da característica do sistema YST (Lee *et al.*, 2006), onde foram clonados no vetor pYST pequenos fragmentos de cDNA (200-300pb) fusionados *in frame* com o gene da invertase (*suc2*). Para obter a ORF completa, as sequências desses clones foram comparadas com sequências de etiquetas expressas (ESTs) de *P. pachyrhizi* depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o algoritmo Blastn. As sequências identificadas como similares foram agrupadas com as sequências originais, utilizando-se o programa CAP3 (<http://bioinformatics.it/ASSEMBLY/assemble.html>). As ORFs foram deduzidas a partir de contíguos obtidos, utilizando-se o programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). As ORFs identificadas na orientação 5'-3' foram submetidas à predição da presença de peptídeo sinal pelo programa SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

2.2 – Amplificação e clonagem das sequências abertas de leitura (ORFs) no vetor pYST-1

As ORFs foram amplificadas a partir de cDNA sintetizado utilizando-se mRNA isolado de folhas de soja coletadas aos seis dias após a inoculação com o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. A extração de RNA total das folhas infectadas foi feita de acordo com o protocolo Plant RNA Isolation Reagent (Invitrogen). O cDNA (primeira fita) foi sintetizado a partir de 5µg do

RNA total utilizando o iniciador Oligo(dT)₂₀, conforme protocolo do kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

Para amplificação das ORFs, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores F e R contendo sítios para *EcoRI* imediatamente a montante (*upstream*) do códon de iniciação (ATG) e *NotI* na extremidade 3' da ORF sem o códon de parada, respectivamente. Os fragmentos de cDNA e o vetor pYST-1 foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e, submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Os produtos da ligação foram transformados em *Escherichia coli* EC100 e, selecionados em meio LB contendo ampicilina 150µg/mL. O DNA plasmidial dos transformantes foi extraído e quantificado para posterior sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Utilizou-se nestas reações 75 a 100 ng de DNA, 0,5 µM do oligonucleotídeo Y5 ou pYSTR-1 (para o vetor pYST), 2,0 µL de DYEnamic™ ET Dye Terminator Sequencing Pré-mix em volume final de 5 µL. As condições da PCR foram: 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 2 minutos repetidas 35 vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 µL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 min a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 min a 3700 rpm. O DNA foi então lavado com etanol 70%, centrifugado a 3700rpm por 10 min e deixado secar por 10 min. Após a precipitação, o DNA foi ressuscitado em Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das reações foi realizada em sequenciador automático MegaBACE™ 1000 de 96 capilares (GE Healthcare) no Laboratório de Genômica – BIOAGRO-UFV.

As sequências dos clones foram comparadas com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através dos algoritmos Blastx e Blastn. Em seguida, as sequências foram comparadas com o banco de anotações do

genoma de *P. pachyrhizi* depositadas no Trace/NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As seqüências obtidas foram montadas utilizando-se o programa CAP3 e a predição das ORFs (*open reading frame*) foi realizada pelo programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). As ORFs foram submetidas à predição da presença de peptídeo sinal pelo programa SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) e a presença de domínios transmembrana pelo programa Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). Através do programa TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) foi possível estimar a localização subcelular das proteínas identificadas. A composição de resíduos de cisteína dos candidatos a efetores selecionados foi descrita, utilizando-se o programa ProtParam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) e os possíveis sítios de formação de pontes de dissulfeto foram identificados utilizando-se o programa DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>). As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos das ORFs deduzidas foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW (CLUSTAL 2.0.12 *multiple sequence alignment*) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

2.3 – Clonagem das ORFs no vetor pENTR™ do sistema Gateway® (Invitrogen)

Foram desenhados dois oligonucleotídeos iniciadores F, com adição do sítio CACC, para clonagem pelo sistema Gateway® (Invitrogen). O primeiro oligonucleotídeo iniciador F1 possui o sítio de recombinação a montante do códon de iniciação seguido da seqüência codificante para o peptídeo sinal, predito pelo programa SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). O segundo oligonucleotídeo iniciador F2, introduz um códon de iniciação *in frame* com a seqüência codificante, sem a região que codifica o peptídeo sinal. O oligonucleotídeo iniciador reverso R contém o respectivo códon de parada. Os amplicons,

amplificados a partir das sequências clonadas no vetor pYST-1 selecionados, foram clonados no vetor pENTR™/D-TOPO® segundo instruções do fabricante (Invitrogen). As ORFs foram então transferidas para o vetor de destino pK7WG2 (Karimi *et al.*, 2002), segundo instruções do *kit Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix* (Invitrogen). O vetor binário pK7WG2 foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Claudine Márcia Carvalho, do Laboratório de Virologia – UFV.

2.4- Expressão transiente dos genes em folhas de tabaco por meio de agroinfiltração

A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) foi transformada por choque térmico com as construções obtidas no item 2.3, e com os vetores binários pK7WG2, pK7WG2-Bax, pK7WG2-GUS, pCAMBIA1305.1, pCAMBIA1305.2, utilizados como construções controle. Os plasmídeos pCAMBIA1305.1, pCAMBIA1305.2 foram inseridos por choque térmico na estirpe KYRT1 (Torisky *et al.*, 1997) de *A. tumefaciens*. O cassete de expressão pYFP-Nac6 (Pinheiro *et al.*, 2009) na estirpe KYRT1 foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas – UFV.

Plantas de *N. tabacum* cultivar Havana 425 foram cultivadas em condições de casa de vegetação. Plantas com oito semanas de idade foram utilizadas para o ensaio de expressão transiente. A agroinfiltração foi efetuada como descrito por Sessa *et al.* (2000) com as seguintes modificações. O meio YEP (Bactotripton 1 %, NaCl 0,5% e extrato de levedura 0,5 %, pH 7,0) foi utilizado para cultivar as agrobactérias sob agitação (280 rpm) por 16h a 28°C. A estirpe EHA105 de *A. tumefaciens* contendo as construções no vetor pK7WG2 foram mantidas em YEP, contendo os antibióticos rifampicina 100 µg.mL⁻¹ e estreptomicina 300 µg.mL⁻¹, enquanto que EHA105 contendo os vetores pCAMBIA1305.1 e pCAMBIA1305.2 foram cultivadas em meio YEP, contendo os antibióticos rifampicina 100 µg.mL⁻¹ e canamicina 50 µg.mL⁻¹. Já os clones de *A.*

tumefaciens KYRT1 contendo os cassetes de expressão pCAMBIA1305.1, pCAMBIA1305.2 e pYFP-Nac6 foram cultivadas em YEP, contendo os antibióticos rifampicina 100 µg.mL⁻¹ e canamicina 50 µg.mL⁻¹. A seguir, as agrobactérias foram coletadas por centrifugação a 4000rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As agrobactérias foram ressuspensas em 5 ml de tampão de infiltração (MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM e acetoseringona 200 µM) e a concentração da suspensão foi ajustada para uma absorbância 0,5 a 600nm (Kelley *et al.*, 2010). A solução foi injetada com seringa de plástico de 1 ml na face abaxial das folhas entre as seções foliares alternadas. Como controle, as seções foliares de tabaco foram infiltradas com o tampão de infiltração. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, e avaliadas diariamente para monitorar o desenvolvimento de sintomas na área infiltrada.

3 - RESULTADOS

Utilizando-se os oligonucleotídeos construídos a partir dos contíguos de sequências de ESTs de *P. pachyrhizi*, foram amplificadas as ORFs de todos os seis genes selecionados, a partir do cDNA sintetizado, utilizando-se mRNA isolado de folhas de soja infectadas com o isolado monopustular PPUFV02 desse fungo.

Foram completamente sequenciadas 22 clones recombinantes obtidos pela clonagem dos fragmentos amplificados com cada par de oligonucleotídeos no vetor pYST-1. Identificaram cinco padrões de sequências amplificadas pelos oligonucleotídeos correspondentes ao gene RSP_PAPH_02 (*Rust Secreted Proteins corresponding to Phakopsora pachyrhizi*) (Fig. 1) e dois padrões de sequências amplificadas pelos oligonucleotídeos do gene RSP_PAPH_05 (Fig. 2). Um único padrão de sequência foi observado para os genes RSP_PAPH_03, RSP_PAPH_04, RSP_PAPH_06 e RSP_PAPH_07. Os diferentes clones receberam a denominação correspondente à ordem da lista de clones registrados e estocados no Laboratório de Genômica (pGPP), como registrado na Tabela 1.

```

pGPP1268      ATGCAATTCCTTACCCCTAGTCACTCTTTTGTATCGCATCTCAGCTGGCATCGTCGGTGCCA 60
pGPP1270      ATGCAATTCCTTACCCCTAGTCACTCTTTTGTATCACATCTCAGCTGGCATCGTCGGTGCCA 60
pGPP1272      ATGCAATTCCTTACCCCTAGTCACTCTTTTGTATCACATCTCAGCTGGCATCGTCGGTGCCA 60
pGPP1276      ATGCAATTCCTTACCCCTAGTCACTCTTTTGTATCACATCTCAGCTGGCATCGTCGGTGCCA 60
pGPP1274      ATGCAATTCCTTACCCCTAGTCACTCTTTTGTATCACATCTCAGCTGGCATCGTCGGTGCCA 60
*****

pGPP1268      CTTGTTGAGCGAGCTGAAACTCGTACCTCTGCAGAGCATGTGAATCAAAAAGGATTCTTT 120
pGPP1270      CTTGCTGAGCGAGCTGAAACTCGTACCTCTGCAGAGCATGTGAATCAAAAAGGATTCTTT 120
pGPP1272      CTTGTTGAGCGAGCTGAAACTCGTACCTCTGCAGAGCATGTGAATCAAAAAGGATTCTTT 120
pGPP1276      CTTGTTGAGCGAGCTGAAACTCGCACCTCTGCAGAGCATGTGAATCAAAAAGGATTCTTT 120
pGPP1274      CTTGTTGAGCGAGCTGAGACTCGCACCTCTGCAGAGCATGTGAATCAAAAAGGATTCTTT 120
*****

pGPP1268      GGAGGACTACCTTGCGCACCTATCGGTGGAATGCTTCCTCCTCCAATTGGCGGTTTCTTG 180
pGPP1270      GGAGGACTACCTTGCGCACCTATCGGTGGAATGCTTCCTCCTCCAATTGGCGGTTTCTTG 180
pGPP1272      GGAGGACTACCTTGCGCACCTATCGGTGGAATGCTTCCTCCTCCAATTGGCGGTTTCTTG 180
pGPP1276      GGAGGACTACCTTGCGCACCTATCGGTGGAATGCTTCCTCCTCCAAGTAGCGGTTTCTTG 180
pGPP1274      GGAGGCTACCTTGCGCACCTATCGGTGGAATGCTTCCTCCTCCAAGTAGCGGTTTCTTG 180
*****

pGPP1268      CCCCCACCACCAATTGGCGGGTTTCTTCCCTCCACCACCAATCGGAGGCTTCGGAGGCTTC 240
pGPP1270      CCCCCACCACCAATTGGCGGGTTTCTTCCCTCCACCACCAATCGGAGGCTTCGGAGGCTTC 240
pGPP1272      CCCCCACCACCAATTGGCGGGTTTCTTCCCTCCACCACCAATCGGAGGCTTCGGAGGCTTC 240
pGPP1276      CCCCCACCACCAATTGGCGGGTTTCTTCCCTCCACCACCAATCGGAGGCTTCGGAGGCTTC 240
pGPP1274      CCCCCACCACCAATTGGCGGGTTTCTTCCCTCCACCACCAATCGGAGGCTTCGGAGGCTTC 240
*****

pGPP1268      GGTGGCCTAGGCGGCTTTGGAGGCCTAGGTGGCTTTGGCGGCCTACCCCTCCACCAATT 300
pGPP1270      GGTGGCCTAGGCGGCTTTGGAGGCCTAGGTGGCTTTGGCGGCCTACCCCTCCACCAATT 300
pGPP1272      GGTGGCCTAGGCGGCTTTGGAGGCCTAGGTGGCTTTGGCGGCCTACCCCTCCACCAATT 300
pGPP1276      GGTGGCCTAGGTGGCTTTGG-----CCTACCCCTCCACCAATT 279
pGPP1274      GGTGGCCTAGGTGGCTTTGG-----TCTACCCCTCCACCAATT 279
*****

pGPP1268      GGCGGATTTCGGTGGTCTTGGATTTCGGTGGACTACCACCTCCCCGATCGGAGGTCTAGGC 360
pGPP1270      GGCGGATTTCGGTGGTCTTGGATTTCGGTGGACTACCACCTCCCCGATCGGAGGTCTAGGC 360
pGPP1272      GGCGGATTTCGGTGGTCTTGGATTTCGGTGGACTACCACCTCCCCGATCGGAGGTCTAGGC 360
pGPP1276      GGCGGATTTCGGTGGTCTTGGATTTCGGTGGACTACCACCTCCCCGATCGGAGGTCTAGGC 339
pGPP1274      GGCGGATTTCGGTGGTCTTGGATTTCGGTGGACTACCACCTCCCCGATCGGAGGTCTAGGC 339
*****

pGPP1268      TTTGGTGGTTTACCTCCCCCTATGATTGGTGGTTTGGAGGTCTAGGAGGTGGAATTGGC 420
pGPP1270      TTTGGTGGTTTACCTCCCCCTATGATTGGTGGTTTGGAGGTCTAGGAGGTGGAATTGGC 420
pGPP1272      TTTGGTGGTTTACCTCCCCCTATGATTGGTGGTTTGGAGGTCTAGGAGGTGGAATTGGC 420
pGPP1276      TTTGGTGGTTTACCTCCCCCTATGATTGGTGGTTTGGAGGTCTAGGAGGTGGAATTGGC 399
pGPP1274      TTTGGTGGTTTACCTCCCCCTATGATTGGTGGTTTGGAGGTCTAGGAGGTGGAATTGGC 399
*****

pGPP1268      GGTATGGTGGTTTCGGTGGAAATGGGTGGTGGTGGTTTCGGTGGTGCCAGCGGATTC AAC 480
pGPP1270      GGTATGGTGGTTTCGGTGGAAATGGGTGGTGGTGGTTTCGGTGGTGCCAGCGGATTC AAC 480
pGPP1272      GGTATGGTGGTTTCGGTGGAAATGGGTGGTGGTGGTTTCGGTGGTGCCAGCGGATTC AAC 480
pGPP1276      GGTATGGTGGTTTCGGTGGAAATGGGTGGTGGTGGTTTCGGTGGTGCCAGCGGATTC AAC 459
pGPP1274      GGTATGGTGGTTTCGGTGGAAATGGGTGGTGGTGGTTTCGGTGGTGCCAGCGGATTC AAC 459
*****

pGPP1268      CGAAACTCTTTCAGCTCTGTTC AATCTGGCTCTTCATCTACGGATTC AAAGCTGGTGGT 540
pGPP1270      CGAAACTCTTTCAGCTCTGTTC AATCTGGCTCTTCATCTAACGGATTC AAAGCTGGTGGT 540
pGPP1272      CGAAACTCTTTCAGCTCTGTTC AATCTGGCTCTTCATCTAACGGATTC AAAGCTGGTGGT 540
pGPP1276      CGAAACTCTTTCAGCTCTGTTC AATCTGGCTCTTCATCTAACGGATTC AAAGCTGGTGGT 519
pGPP1274      CGAAACTCTTTCAGCTCTGTTC AATCTGGCTCTTCATCTAACGGATTC AAAGCTGGTGGT 519
*****

pGPP1268      GGACAAATACGCGGAGCTGGTGGTTT-AGGTGGAATTGGTGGAAATGGGTGGTTTCTTGAA 599
pGPP1270      GGACAAATACGCGGAGCTGGTGGTTT-AGGCGGAATTGGTGGAAATGGGTGGTTTCTTGAA 599
pGPP1272      GGACAAATACGCGGAGCTGGTGGTTT-AGGTGGAATTGGTGGAAATGGGTGGTTTCTTGAA 599
pGPP1276      GGACAAATACGCGGAGCTGGTGGTTT-AGGTGGAATTGGTGGAAATGGGTGGTTTCTTGAA 578
pGPP1274      GGCCAAATTTGGCGGAGCTGGTGGTTT-AGGTGGAATTGGTGGAAATGGGTGGTTTCTTGAA 579
*****

pGPP1268      AAAAAACAAAGAGAAGAGCGAAGCATAA 627
pGPP1270      AAAAAACAAAGAGAAGAGCGAAGCATAA 627
pGPP1272      AAAAAACAAAGAGAAGAGCGAAGCATAA 627
pGPP1276      AAAAAACAAAGAGAAGAGCGAAGCATAA 606
pGPP1274      AAAAA-CAAAGAGAAGAGCGAAGCATAA 606
*****

```

Figura 1. Alinhamento múltiplo das sequências dos diferentes clones das sequências abertas de leitura amplificadas a partir de cDNA de folhas infectadas com oligonucleotídeos derivados da sequência aberta de leitura do contíguo de ESTs RSP_PAPH_02.

```

pGPP1308      ATGAAATTGTCATGTGCCTATCTGATTGTTCTCATCTCTGTCCTATCTTCCACTTTTGTG 60
pGPP1305      ATGAAATTGTCATGTGCCTATCTGATTGTTCTCATCTCTGTCCTGTCTTCAACTTTTGTG 60
*****

pGPP1308      GCAGCTGATGATGTTAGCGACAAGAGCGGTGAAGTCTCTGACAGCAAAATCTTTGGTTAT 120
pGPP1305      GCAGCTGAGGATGTTAGCGATAAAAAACGCTGAAGTCTCTGACAGCAAGTCTTTC----T 115
*****

pGPP1308      GGACTAGGTGGTCTTGGAGG-TTGGGGCTACTGGGGA-GGTGGTTATTTTCTGGTCTTG 178
pGPP1305      GGACTAGGTGGTCTTGGGGGTTGGGGTACTGGGGACGGTGGTAGATTTGCTGGTCTTG 175
*****

pGPP1308      GTGGATACTCGTGGTT-GAACCCATGGAATGGGAAATGCCTACGGGTTTGGTCTTACC-G 236
pGPP1305      GTGGATACTCGTGGTTAGAACCCATGGAATGGGAAATGCCTACGGATTTGGTCTATACCAG 235
*****

pGPP1308      CGGATTTTAT-GGTGGAT-GGCT-CAAAATCGGCTGATGGT-CTCCAAGAGCGTCGATCAA 292
pGPP1305      CGGATTTGATAGGTGGATAGGCTACAAATCGGCTGATGGTACCAAGAGCGTCGATCAA 295
*****

pGPP1308      TCCAGGAATTGCACAACCTCATGTACAGGGCTGATCACACC-GTATCCTGCAAGA-ACAA 350
pGPP1305      TCCAGGAATTACACAACCTCATGTCAAGGGCTGATCACACAAGTTTCATGCAAGACACAT 355
*****

pGPP1308      GAACGGTGAAGTTGCTCATTTTCGAAACCAAGAGCTGCTTGAGTGTGCTAACAAAGTTGGC 410
pGPP1305      GAACGGGAAGAATGCTCATTTTCGAAACCAAGAGCTGCTTGAGTGTGCTGCAAAACAAAGTTAGC 415
*****

pGPP1308      TAATCAACA-CGCTTCTAGTGTACCTGTGGA-GCGTGCTCTCTAAGCATCCAAGGTCCC 468
pGPP1305      TAATCAACAACGCTTCGAGCGTACCTGTGNCGCGTGTCTCTGAGCATCCAAGGTCCC 475
*****

pGPP1308      AA-TGGT-GCT-CTAT-CTGC-CAAGTCTATT-CCACCACCT-GAGTTGGCTAAGGGCGAC 521
pGPP1305      AAANGGTAGCTACTATACTGCACAAGTCTATTACCATCATCTAGAGTTGACAAAGGGCGAC 535
**

pGPP1308      TCTTAACATTTTGAAGGCTTGCGCTAAA-GGTGAAAGCAAGATGCTTG--CTGTTTCAGA 578
pGPP1305      TCTCAACATTAAGAAGGCTTGCGCCAAAAGGTGAAAGCAAGATGCTTGAAATCGTTCAGA 595
**

pGPP1308      GCTTGAGCGCCGCTCTCCATTGCCCCAGGAAATCCATCT--CAATCCTCATCCAGCAAC 636
pGPP1305      ACTTGAACGCGG-TCTCCATTACCGGAGGAAATCCATACTACAATCTTCGTCTAGCAAC 654
*****

pGPP1308      GAAA-AGAACTCTAAGGATGCATTTGCAG--TTGTGCT-CCTG---AAAGGCAA--CGGG 687
pGPP1305      GGCACAAGAGCCCAAGGATGCATTTGCAGTTTGTGCTACCTNGACAAAGGCACACCGGG 714
*

pGPP1308      CC-GGCCTGTGCTTAG 702
pGPP1305      CCAGGCCTGTGCTTAG 730
**

```

Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências dos diferentes clones das sequências abertas de leitura amplificadas a partir de cDNA de folhas infectadas com oligonucleotídeos derivados da sequência aberta de leitura do contígua de ESTs RSP_PAPH_05.

Tabela 1. Denominação e tamanho (pb) dos genes candidatos a efetores.

Candidatos a efetores	Clones	Tamanho (pb)
RSP_PAPH_02	pGPP1276	606
	pGPP1268	627
	pGPP1270	627
	pGPP1272	627
	pGPP1274	606
RSP_PAPH_03	pGPP1278	375
RSP_PAPH_04	pGPP1280	1176
RSP_PAPH_05	pGPP1305	696
	pGPP1308	702
RSP_PAPH_06	pGPP1339	627
RSP_PAPH_07	pGPP1341	696

Apesar do polimorfismo verificado nas sequências das ORFs dos clones pGPP1268, 1272, 1270, 1276 e 1274 correspondentes ao gene RSP_PAPH_02, e dos clones pGPP1305 e 1308 correspondentes ao gene RSP_PAPH_05, todas geraram sequências abertas de leitura clonadas no vetor pYST-1 *in frame* com o gene da invertase. Além disso, todas as ORFs deduzidas codificaram polipeptídeos com peptídeo sinal de secreção sem domínio transmembrana, com nível de confiabilidade máximo (RC=1) para predição de secreção celular (Tabela 2).

As proteínas deduzidas dos clones pGPP1305 e pGPP1308 do gene RSP_PAPH_05 e o clone pGPP1341 do gene RSP_PAPH_07 apresentaram uma maior quantidade de resíduos de cisteína em sua composição, respectivamente, 7(3,0%), 7(3,0%) e 6(2,6%). As demais proteínas deduzidas dos outros clones apresentaram apenas um resíduo de cisteína. Os clones pGPP1305, pGPP1308 e pGPP1341 apresentaram maior número de resíduos de cisteína e também as menores quantidades de resíduos de glicina e prolina respectivamente, 26(11,3%) e 7(3,0%), 28(12,0%) e 9(3,9%), 26(11,3%) e 7(3,0%) (Tabela 3). As sequências das proteínas deduzidas a partir das sequências dos clones pGPP1305, pGPP1308 e pGPP1341 apresentam predição positiva para três pontes de dissulfeto (Fig. 3).

Tabela 2. ORFs preditas para candidatos a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* que apresentaram predição positiva (Y) em cinco ou mais parâmetros do programa SignalP e foram analisados com outros algoritmos de predição.

Candidato	Nº aa	PS	Blastx	Blastn			Trace		SignalP		TargetP		Phobius
			Predição	Acesso	Predição	E-value	Acesso	E-value	NN	HMM	Loc	RC	0
pGPP1276	201	18	no hit	EH261625	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452196760	0.0	0,882	0,999	S	1	0
pGPP1268	208	18	no hit	EH261625	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452196760	0.0	0,887	1	S	1	0
pGPP1270	208	18	no hit	EH261625	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452196760	0.0	0,863	0,999	S	1	0
pGPP1272	208	18	no hit	EH261625	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452196760	0.0	0,883	0,999	S	1	0
pGPP1274	201	18	no hit	EH261625	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452196760	0.0	0,883	0,999	S	1	0
pGPP1278	124	20	no hit	EH262039	cDNA Phakopsora pachyrhizi	3,00E-171	ti:452023563	5,00E-120	0,914	0,992	S	1	0
pGPP1280	391	18	no hit	EH247385	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452114268	0.0	0,818	0,999	S	1	0
pGPP1305	231	22	no hit	EH251313	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:455493036	0.0	0,881	0,995	S	1	0
pGPP1308	233	22	no hit	EH262713	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:453327785	0.0	0,864	0,997	S	1	0
pGPP1339	208	18	no hit	EH258665	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:452196760	0.0	0,883	0,999	S	1	0
pGPP1341	231	22	no hit	EH262713	cDNA Phakopsora pachyrhizi	0.0	ti:453327785	0.0	0,881	0,995	S	1	0

aa – aminoácidos; PS – tamanho do peptídeo sinal; NN – neural network method; HMM – hidden Markov model; Loc – localização celular; S – proteína secretada; RC – coeficiente de confiabilidade.

Tabela 3. Composição de aminoácidos dos clones selecionados, obtida com o programa ProtParam.

Clone	Ala(A)	Arg(R)	Asn(N)	Asp(D)	Cys(C)	Gln(Q)	Glu(E)	Gly(G)	His(H)	Ile(I)	Leu(L)
pGPP1276	4.0% (8)	1.5% (3)	2.5% (5)	0	0.5% (1)	2.5% (5)	2.5% (5)	31.8% (64)	0.5% (1)	4.5% (9)	9.5% (19)
pGPP1268	4.3% (9)	1.4% (3)	1.9% (4)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	2.4% (5)	33.7% (70)	0.5% (1)	4.8% (10)	9.6% (20)
pGPP1270	4.3% (9)	1.4% (3)	2.4% (5)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	2.4% (5)	33.7% (70)	0.5% (1)	4.8% (10)	9.6% (20)
pGPP1272	3.8% (8)	1.4% (3)	2.4% (5)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	2.4% (5)	33.7% (70)	1.0% (2)	4.8% (10)	9.1% (19)
pGPP1274	4.0% (8)	2.0% (4)	3.5% (7)	0	0.5% (1)	2.5% (5)	3.0% (6)	29.9% (60)	0.5% (1)	4.0% (8)	9.0% (18)
pGPP1278	4.8% (6)	7.3% (9)	3.2% (4)	0.8% (1)	0.8% (1)	1.6% (2)	3.2% (4)	25.8% (32)	0	1.6% (2)	1.6% (2)
pGPP1280	2.6% (10)	0.8% (3)	1.5% (6)	1.0% (4)	0.3% (1)	1.3% (5)	0.8% (3)	38.6% (151)	1.5% (6)	7.4% (29)	11.5% (45)
pGPP1305	11.3% (26)	3.0% (7)	5.2% (12)	2.6% (6)	3.0% (7)	2.2% (5)	5.6% (13)	11.3% (26)	2.2% (5)	3.0% (7)	10.8% (25)
pGPP1308	10.7% (25)	2.6% (6)	5.2% (12)	3.0% (7)	3.0% (7)	2.1% (5)	5.2% (12)	12.0% (28)	1.7% (4)	3.0% (7)	11.2% (26)
pGPP1339	3.8% (8)	1.4% (3)	2.9% (6)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	2.4% (5)	33.7% (70)	0.5% (1)	5.8% (12)	9.6% (20)
pGPP1341	11.3% (26)	3.0% (7)	5.2% (12)	2.6% (6)	2.6% (6)	2.2% (5)	5.6% (13)	11.3% (26)	2.2% (5)	3.0% (7)	10.8% (25)

Ala(A) – alanina; Arg(R) – arginina; Asn(N) – asparagina; Asp(D) – aspartato; Cys(C) – cisteína; Gln(Q) – glutamina; Gly(G) – glicina; His(H) – histidina; Ile(I) – isoleucina; Leu(L) – leucina.

Tabela 3 (continuação). Composição de aminoácidos dos clones selecionados, obtida com o programa ProtParam.

Clone	Lys(K)	Met(M)	Phe(F)	Pro(P)	Ser(S)	Thr(T)	Trp(W)	Tyr(Y)	Val(V)	Pyl(O)	Sec(U)
pGPP1276	3.0% (6)	3.0% (6)	9.0% (18)	12.4% (25)	7.0% (14)	2.5% (5)	0	0.5% (1)	3.0% (6)	0	0
pGPP1268	2.9% (6)	2.9% (6)	9.1% (19)	12,0% (25)	6.7% (14)	1.9% (4)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	0	0
pGPP1270	2.9% (6)	2.9% (6)	9.1% (19)	12,0% (25)	6,2% (13)	2.4% (5)	0	0.5% (1)	1.9% (4)	0	0
pGPP1272	2.9% (6)	2.9% (6)	9.1% (19)	12,0% (25)	6,2% (13)	2.4% (5)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	0	0
pGPP1274	2.5% (5)	2.5% (5)	10.0% (20)	12.4% (25)	6.5% (13)	2.5% (5)	2.0% (4)	0	3.0% (6)	0	0
pGPP1278	2.4% (3)	2.4% (3)	4.0% (5)	13.7% (17)	4.0% (5)	1.6% (2)	12.9% (16)	1.6% (2)	6.5% (8)	0	0
pGPP1280	1.5% (6)	1.0% (4)	6.4% (25)	16.6% (65)	4.1% (16)	1.5% (6)	0	0	1.5% (6)	0	0
pGPP1305	6.5% (15)	2.2% (5)	3.0% (7)	3.0% (7)	13.4% (31)	3.0% (7)	2.2% (5)	2.6% (6)	3.9% (9)	0	0
pGPP1308	6.9% (16)	1.7% (4)	3.4% (8)	3.9% (9)	13.3% (31)	2.1% (5)	2.1% (5)	3.0% (7)	3.9% (9)	0	0
pGPP1339	2.4% (3)	2.4% (3)	9.1% (19)	12,0% (25)	6.2% (13)	2.4% (5)	0	0.5% (1)	2.4% (5)	0	0
pGPP1341	6.5% (15)	2.2% (5)	3.0% (7)	3.0% (7)	13.4% (31)	3.0% (7)	2.2% (5)	3.0% (7)	3.9% (9)	0	0

Lys(K) – lisina; Met(M) – Metionina; Phe(F) – fenilalanina; Pro(P) – prolina; Ser(S) – serina; Thr(T) – treonina; Trp(W) – triptofano; Tyr(Y) – tirosina; Val(V) – valina; Pyl(O) – pirrolisina; Sec(U) – selenocisteína

pGPP1305	
Predicted bonds	
112 - 144	DHTVSCKNMNG - ASSATCGACSL
127 - 147	FETKSCLSAAN - ATCGACSLSIQ
179 - 230	NILKACAKGES - GNGPACAXXX
pGPP1308	
Predicted bonds	
5 - 181	XMKLSCAYLIV - NILKACAKGES
114 - 146	DHTVSCKNKNG - ASSATCGACSL
129 - 149	FETKSCLSAAN - ATCGACSLSIQ
pGPP1341	
Predicted bonds	
112 - 144	DHTVSCKNMNG - ASSATCGACSL
127 - 147	FETKSCLSAAN - ATCGACSLSIQ
179 - 230	NILKACAKGES - GNGPACAXXX

Figura 3. Predição de pontes de dissulfeto para as proteínas codificadas pelos clones pGPP1305, pGPP1308 e pGPP1341.

Dentre os seis genes candidatos a efetores, foi observado polimorfismo de sequências de aminoácidos nas sequências protéicas deduzidas das ORFs geradas pelos genes RSP_PAPH_02 e, entre RSP_PAPH_05 e RSP_PAPH_07, evidenciado nos alinhamentos múltiplos ilustrados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Observa-se no alinhamento dos clones pGPP1305, pGPP1308 e pGPP1341 a presença de um domínio semelhante ao RXLR-EER encontrado em oomicetos (Win *et al.*, 2007; Birch *et al.*, 2008) (Fig. 5). Pode-se verificar no alinhamento presente na figura 6, entre os clones dos candidatos RSP_PAPH_02, RSP_PAPH_04 e RSP_PAPH_06 a presença de um padrão “LPPXGGF”, que repete-se no mínimo cinco vezes em todos os clones.

Foram obtidas 22 construções no vetor binário pK7WG2, sendo que onze possuem as ORFs completas presentes nos clones caracterizados e onze possuem as mesmas ORFs sem a sequência codificadora do peptídeo sinal. Para testar a atividade efetora, os 22 clones foram transformados em *Agrobacterium* para os ensaios de expressão transiente em folhas de *Nicotiana tabacum*. Aos sete dias após a infiltração (7dpi) com agrobactéria EHA105, as seções foliares de tabaco infiltradas com os clones pGPP1308 e pGPP1341 no vetor binário pK7WG2 apresentaram um amarelecimento intenso na seção foliar infiltrada. Aos 9dpi, foi observada a necrose na seção foliar infiltrada com o clone pGPP1308 e 12 horas depois, a HR foi observada na área foliar correspondente ao clone pGPP1341. Aos 12dpi, a HR foi observada na área foliar infiltrada com o clone pGPP1340 (Fig. 7). Entretanto, não foi detectado o mesmo fenótipo nas outras seções foliares das respectivas réplicas. Observou-se, dos 7 aos 12dpi, uma leve reação clorótica nas seções foliares após agroinfiltração com as construções controle pK7WG2-Bax, pCAMBIA1305.1, pCAMBIA1305.2 e com o restante dos clones em pK7WG2 em *A. tumefaciens* EHA105. Foi observado, no mesmo intervalo de tempo, a reação clorótica sutil nas áreas foliares infiltradas com a agrobactéria KYRT1 contendo os cassetes de expressão pCAMBIA1305.1, pCAMBIA1305.2 e pYFP-Nac6. Esta reação clorótica sutil não diferiu das reações observadas nas plantas infiltradas com a suspensão de *Agrobacterium* contendo o vetor pK7WG2 vazio, nas condições de inoculação utilizadas.

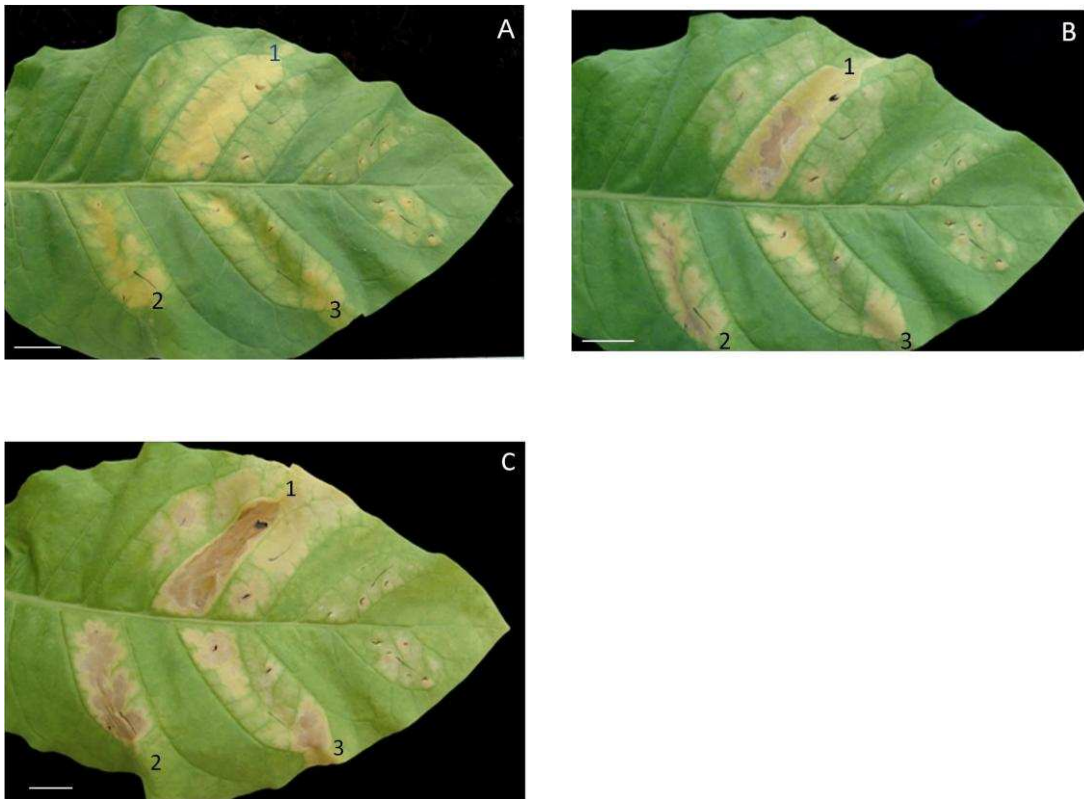


Figura 7. Expressão transiente dos clones dos candidatos a efetores em folhas de *N. tabacum*. Sintomas observados após a agroinfiltração com as construções no vetor binário pK7WG2: 1. pGPP1308; 2. pGPP1341; 3. pGPP1340. A. Aos 7 dias após a agroinfiltração. B. Aos 9 dias após a agroinfiltração. C. Aos 12 dias após a agroinfiltração. Escala da barra= 2 cm.

4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram caracterizados seis genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas que apresentam características comuns a efetores fúngicos (Bowen *et al.*, 2009), isto é, são relativamente pequenas, com menos de 400 aa, apresentam peptídeo sinal na extremidade N-terminal, não apresentam domínio transmembrana e, portanto, são secretadas, e algumas delas possuem resíduos de cisteína. As proteínas deduzidas dos clones pGPP1305, pGPP1308 e pGPP1341 apresentaram, respectivamente, 7(3,0%), 7(3,0%) e 6(2,6%) resíduos de cisteína na sua composição, e predição positiva para formação de pontes de dissulfeto. Estas pontes conferem maior estabilidade para proteínas a proteases da planta no meio extracelular, e pode fornecer vantagens adaptativas, como já descrito para o fungo filamentoso *Aspergillus saitoi*, em que a presença tanto de pontes de dissulfeto, quanto de resíduos de cisteína livre contribuem para a termoestabilidade da enzima 1,2- α -manosidase, envolvida do metabolismo de carboidratos (Tatara *et al.*, 2005). Em fungos fitopatogênicos, como *Cladosporium fulvum*, mutantes no gene *Avr4* que resultam em substituição dos resíduos cisteínas fazem com que a proteína *Avr4* seja mais sensível a proteases da planta de tomateiro, sem afetar a sua atividade efetora de ligação à quitina da parede celular do fungo (van den Burg *et al.*, 2003).

As proteínas deduzidas dos clones pGPP1305, pGPP1308 e do clone pGPP1341 apresentam uma sequência de aminoácidos semelhante ao domínio conservado RXLR-EER, encontrado em oomicetos, envolvido na translocação de proteínas para dentro do citoplasma das células do hospedeiro (Win *et al.*, 2007; Birch *et al.*, 2008; Grouffaud *et al.*, 2008). Whisson *et al.* (2007) demonstraram que o domínio RXLR-EER não é requerido para a secreção do efetor *Avr3a* do haustório de *P. infestans*, mas é necessário para translocação do efetor do haustório para células infectadas de batata. Portanto, é interessante que sejam realizados estudos direcionados a determinar se o domínio RGLY/QERR pode estar envolvido na translocação de proteínas efetoras de *P. pachyrhizi* para dentro das células vegetais.

A presença de polimorfismo entre dois candidatos a efetores RSP_PAPH_02 e RSP_PAPH_05 pode indicar que esses genes são alélicos ou membros de uma família multigênica. A condição dicariótica predominante no ciclo de vida das ferrugens torna a primeira hipótese exequível, todavia somente a análise da organização genômica desses genes por meio da análise de *Southern blotting* permitirá determinar qual hipótese é a correta. É interessante ressaltar que genes que codificam proteínas efetoras que são alvos do sistema imune da planta apresentam uma maior diversidade nucleotídica. Por exemplo, verificou-se uma variação na sequência dos genes que codificam para os efetores AvrP123 e AvrP4 de *M. lini*, agente etiológico da ferrugem do linho (Barret *et al.*, 2009). A expressão transiente dos variantes polimórficos de ambos os genes mostrou que eles são diferencialmente reconhecidos por genes de resistência em *Linum marginale*. Estas variações são importantes por conferir vantagem adaptativa e por isso são mantidas entre diferentes isolados de *M. lini* (Barret *et al.*, 2009). A presença de variantes polimórficos entre estes genes candidatos de *P. pachyrhizi* pode indicar uma certa importância efetora das proteínas codificadas no processo infectivo, todavia, essa possibilidade tem que ser suportada por uma análise de diversidade nucleotídica em um número maior de isolados de *P. pachyrhizi*.

Verificou-se também a presença de um padrão (LPPPXGGF) que se repete nos candidatos RSP_PAPH_02, RSP_PAPH_04 e RSP_PAPH_06. Isso pode sugerir que esses possíveis efetores façam parte de uma família multigênica e que a sequência LPPPXGGF possa apresentar alguma importância funcional ou estrutural. Regiões ricas no aminoácido prolina normalmente apresentam um papel estrutural, particularmente de aderência explicada por este aminoácido possuir uma estrutura quimicamente coesa e rígida (Williamson, 1994). Estudos de imunolocalização são fundamentais para determinar a localização das proteínas codificadas por esses genes, assim como os demais genes identificados nesse trabalho, associados a estudos funcionais ou populacionais que corroborem o seu papel efetor.

A técnica de expressão transiente via agroinfiltração constitui uma alternativa atraente para obter indícios da atividade efetora de proteínas sem

atividade conhecida, entretanto, algumas espécies como soja, arroz e milho apresentam dificuldades para infiltração do mesófilo foliar (Van der Hoorn *et al.*, 2000). Desta forma, decidiu-se efetuar inicialmente um estudo funcional de efetores de *P. pachyrhizi* em tabaco, espécie não hospedeira do fungo. Durante a interação com plantas hospedeiras e não hospedeiras, este patógeno induz a morte celular das células epidérmicas inicialmente infectadas (Loehrer *et al.*, 2008). Assim, o objetivo desse experimento era determinar se algum dos genes candidatos caracterizados poderia codificar uma proteína envolvida nesta etapa da patogênese. Todavia, a ausência do fenótipo de necrose nos controles positivos cujas proteínas sabidamente desencadeiam a morte celular, tais como Bax (Lacomme & Santa Cruz, 1999) e NAC6 (Pinheiro *et al.*, 2009), inviabilizam uma análise conclusiva da necrose ativada pelos clones infiltrados. A expressão transiente do gene *gus* (Ridout *et al.*, 2006; Dou *et al.*, 2008b) e o resultado futuro do teste histoquímico das folhas de tabaco servirá como indicação da eficiência da infiltração de *Agrobacterium* contendo as ORFs dos 22 clones testados.

A técnica de expressão transiente via agroinfiltração tem sido utilizada para analisar e comparar quantitativamente as diferentes respostas induzidas pelas interações *Avr/Cf* em diversas espécies de tabaco. Tem-se verificado uma expressão diferencial temporal entre as atividades das proteínas efetoras. Por exemplo, a necrose induzida na interação *Avr9/Cf9* desenvolve-se mais lentamente que na interação *Avr4/Cf4*, sugerindo que esta diferença temporal seja devido às divergências nas atividades dos genes *Avr* (Van der Hoorn *et al.*, 2000). É possível que essa a divergência possa explicar a diferença temporal no aparecimento da HR nas áreas foliares nos resultados preliminares de estudo funcional dos genes candidatos em tabaco.

Como não existe um protocolo de transformação de *P. pachyrhizi* disponível, é um requisito primordial para os avanços na identificação de efetores desse patógeno, o estabelecimento de protocolos de expressão transiente de genes candidatos em folhas de genótipos de soja resistentes e suscetíveis à *P. pachyrhizi* a fim de se identificar genes que codificam

efetores que são reconhecidos pelas proteínas R codificadas pelos diferentes genes de resistência correspondentes em soja. Neste caso particular, é promissor o sistema EDV (*Effector delivery vector*) baseado no sistema de secreção tipo III, pela capacidade de análise de múltiplos candidatos e por permitir inferências sobre a contribuição dos efetores na patogênese (Sohn *et al.*, 2007).

5 – CONCLUSÕES GERAIS

O isolado monopustular PPUFV02 de *Phakopsora pachyrhizi* foi avirulento nos genótipos de soja PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487 e PI 471904 que contêm, respectivamente, os genes de resistência *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp4*, *Rpp5*. A resistência desses genótipos se manifestou na forma de lesões tipo RB. Foi verificado também a ocorrência de lesões tipo RB nos genótipos de soja PI 587880-A, PI 594767-A, PI 561356, PI 587905 e ausência de sintomas no genótipo PI 594754, indicando que esse isolado possui genes de avirulência complementares a genes de resistência ainda não caracterizados geneticamente nesses genótipos.

Foram obtidas as seqüências completas de seis genes do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas com características típicas de efetores, ou seja, são proteínas de função desconhecida, pequenas (<400 aa), com peptídeo sinal de secreção na região N-terminal e algumas delas com resíduos de cisteína capazes de formar pontes de dissulfeto. Estudos preliminares de agroinfiltração em tabaco revelaram que três genes, RSP_PAPH_05, RSP_PAPH_06 e RSP_PAPH_07, codificam proteínas capazes de induzir necrose em tabaco. Esse resultado é consistente com o mecanismo de patogênese de *P. pachyrhizi*. Todavia, estudos adicionais são necessários para confirmar os resultados obtidos em tabaco e para verificar se os mesmos resultados são obtidos em outras plantas não hospedeiras e em soja.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramovitch, R.B.; Anderson, J.C.; Martin, G.B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.7, p.601-611, 2006.

Alves, M.C.; Pozza, E.A.; Ferreira, J.; Araújo, D.V.; Costa, J.C.; Deuner, C.C.; Muniz, M.F.; Zambenedetti, E.B.; Machado, J.C. Intensidade da ferrugem asiática da soja nos cultivares Conquista, Savana e Suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.128, 2005.

Barret, L.G.; Thrall, P.H.; Dodds, P.N.; van der Merwe, M.; Linde, C.C.; Lawrence, G.J.; Burdon, J.J. Diversity and evolution of effector loci in natural populations of the plant pathogen *Melampsora lini*. *Molecular Biology and Evolution*, v.26, n.11, p.2499-2513, 2009.

Birch, P.R.; Rehmany, A.P.; Pritchard, L.; Kamoun, S.; Beynon J.L. Trafficking arms: Oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in Microbiology*, v.14, p.8-11, 2006.

Birch, P.R.; Boevink, P.C.; Gilroy, E.M.; Hein, I.; Pritchard, L., & Whisson, S.C. Oomycete RXLR effectors: Delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, v.11, p.373-379, 2008.

Block, A.; Li, G.; Fu, Z.Q.; Alfano, J.R. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, v.11, p.396-403, 2008.

Bos, J.I.B.; Kanneganti, T-D; Young, C.; Cakir, C.; Huiterna, E.; Win, J.; Armstrong, M.R.; Birch, P.R.J.; Kamoun, S. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, v.48, p.165-176, 2006.

Bowen, J.K.; Mesarich, C.H.; Ress-George, J.; Cui, W.; Fitzgerald, A.; Win, J.; Plummer, K.M.; Templeton, M.D. Candidate effector gene identification in the ascomycete fungal phytopathogen *Venturia inaequalis* by expressed sequence tag analysis. *Molecular Plant Pathology*, v.10, n.3, p.431-448, 2009.

Bromfield, K.R. Soybean Rust. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 1984.65p (American Phytopathological Society. Monograph, 11).

Bromfield K. R. & Hartwig E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, v.20, p.254-255, 1980.

Brommonschenkel, S.H. Zaramela, L.S., Gava, S.G. & Oliveira, J. C. Identification of secreted soluble proteins from *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of the Asian soybean rust. p.64 In: Resumos do 55^o Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, 30 a 02 de setembro de 2009. <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2009/GM058-29952.pdf>

Calvo, E.S.; Kiihl, R.A.S.; Garcia, A.; Harada, A.; Hiromoto, D.M. Two major recessive soybean genes conferring soybean rust resistance. *Crop Science*, v.48, p.1350-1354, 2008.

Catanzariti, A-M.; Dodds, P. N.; Lawrence, G. J.; Ayliffe, M. A.; Ellis, J. G. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant Cell*, v.18, p.243-256, 2006.

Chakraborty, N.; Curley, J.; Frederick, R.D.; Hyten, D.L.; Nelson, R.L.; Hartman, G.L.; Diers, B.W. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. *Crop science*, v.49, p.783-790, 2009.

Chisholm, S.T.; Coaker, G.; Day, B.; Staskawicz, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, v.124, p.803-814, 2006.

Chugh, A & Eudes, F. Cellular uptake of cell-penetrating peptides pVEC and transportan in plants. *Journal of Peptide Science*, v.14, p.477-481, 2008.

Collmer, A.; Badel, J.L.; Charkowski, A.O.; Deng, W.L.; Fouts, D.E.; Ramos, A.R.; Rehm, A.H.; Anderson, D.M.; Schneewind, O.; van Dijk, K. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.97, p.8770-8777, 2000.

Damasceno, C.M.; Bishop, J.G.; Ripoll, D.R.; Win, J.; Kamoun, S. & Rose, J.K. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from phytophthora species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.21, p.820-830, 2008.

Dangl, J.L. & McDowell, J. M. Two modes of pathogen recognition by plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.103, p.8575-8576, 2006.

De Wit, P.J.G. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.64, p.2726-2732, 2007.

Dean, R. A.; Talbot, N. J.; Ebbole, D. J.; Farman, M. L.; Mitchell, T. K.; Orbach, M. J.; Thon, M.; Kulkarni, R.; Xu, J. R.; Pan, H.; Read, N.D.; Lee, Y.-H.; Carbone, I.; Brown, D.; Oh, Y.Y.; Donofrio, N.; Jeong, J.S.; Soanes, D.M.; Djonovic, S.; Kolomiets, E.; Rehmeyer, C.; Li, W.; Harding, M.; Kim, S.; Lebrun, M.-H.; Bohnert, H.; Coughlan, S.; Butler, J.; Calvo, S.; Ma, L.-J.; Nicol, R.; Purcell, S.; Nusbaum, C.; Galagan, J.E; Birren, B.W. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, v.434, p.980-986, 2005.

Diatchenko, L.; Lau, Y. F.; Campbell, A. P.; Chenchik, A.; Moqadam, F.; Huang, B.; Lukyanov, B.; Lukyanov, K.; Gurskaya, N.; Sverdlov, E. D.; Siebert, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 12, p. 6025-6030, 1996.

Dodds, P.N.; Rafiqi, M.; Gan, P.H.P.; Hardham, A.R.; Jones, D.A; Ellis, J.G. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist*, v.183, p.993-1000, 2009.

Dou, D.; Kale, S.D.; Wang, X.; Chen, Y.; Wang, Q.; Wang, Y.; Jiang, R.H.; Arredondo, F.D.; Anderson, R.G.; Thakur, P.B. Carboxy-terminal motifs common to many oomycete RXLR effectors are required for avirulence and suppression of BAX-mediated programmed cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *Plant Cell*, v.20, p.1118-1133, 2008a.

Dou, D.; Kale, S.D.; Wang, X.; Chen, Y.; Wang, Q.; Jiang, R.H.; Arredondo, F.D.; Anderson, R.G.; Thakur, P.B.; McDowell, J.M.; Wang, Y.; Tyler, B.M. Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *Plant Cell*, v.20, p.1118–1133, 2008b.

Dou, D.; Kale, S.D.; Wang, X.; Jiang, R.H.Y.; Bruce, N.A.; Arredondo, F.D.; Zhang, X.; Tyler, B.M. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen encoded machinery. *Plant Cell*, v.20, p.1930-1947, 2008c.

Embrapa Soja. Disponível em:

http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17. Acesso em 01 maio 2010.

Embrapa Soja – Consórcio Antiferrugem. Disponível em:

<http://www.consorcioantiferrugem.net>. Acesso em 01 maio 2010.

Erickson, F.; Holzberg, S.; Calderon-Urrea, A.; Handley, V.; Axtell, M.; Corr, C.; Baker, B. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defense response in tobacco. *Plant Journal*, v.18, p.67-75, 1999.

Flor, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, v.32, p.653-669, 1942.

Frankel, A.D. & Pabo, C.O. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, v.55, p.1189–1193, 1988.

Frederick, R. D.; Snyder, C.L.; Peterson, G.L.; Bonde, M.R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology*, v.92, n.2, p.217-227, 2002.

Frederick, R.D.; Thilmony, R.L.; Sessa, G.; Martin, G.B. Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Molecular Cell*, v.2, p.241–245, 1998.

Furtado, G. Q. Ferrugem asiática da soja: métodos de preservação dos urediniósporos e fatores relacionados à infecção do hospedeiro. *Dissertação (Doutorado em Fitopatologia)*, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 79f, 2007.

Garcia, A.; Calvo, E.S.; Kiihl, R.A. de S.; Harada, A.; Hiromoto, D.M.; Vieira, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: Discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, v.117, p.545-553, 2008.

Godoy, C.V.; Koga, L.J.; Canteri, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, n.1, p.63-68, 2006.

Goellner, K.; Loehrer, M.; Langenbach, C.; Conrath, U.; Koch, E.; Schaffrath, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, v.11, n.2, p.169-177, 2010.

Grouffaud, S.; van West, P.; Avrova, A.O.; Birch, P.R. & Whisson, S.C. *Plasmodium falciparum* and *Hyaloperonospora parasitica* effector translocation motifs are functional in *Phytophthora infestans*. *Microbiology*, v.154, p.3743–3751, 2008.

- Guerche, P.; Bellini, C.; Le Moullec, J.M.; Caboche, M. Use of a transient expression assay for the optimization of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. *Biochimie*, v.69, p.621-628, 1987.
- Hartman, G. L.; Miles, M.R.; Frederick, R.D. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, v.89, n.6, p.664-666, 2005.
- Hartwig, E.E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to rust in soybeans. *Crop Science*, v.26, p.1135-1136, 1986.
- Hartwig, E.E & Bromfield, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science*, v.23, p.237-239, 1983.
- Herman, J.C. Como a planta de soja se desenvolve. (Special Report, 53). Tradução de G.M. de Souza Câmara. Piracicaba: Potafós, 1997, 22p. (Arquivo do Agrônomo, 11).
- Hood, E.E.; Gelvin, S.B.; Melchers, L.S.; Hoekema, A. New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, v.2, p.208-218, 1993.
- Hyten, D.L.; Hartman, G.L.; Nelson, R.L.; Frederick, R.D.; Concibido, V.C.; Narvel, J.M.; Cregan, P.B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. *Crop Science*, v.47, p.837-838, 2007.
- Jacobs, K. A. A genetic selection for isolating cDNA encoding secreted proteins. *Genes*, v.198, p.289-296, 1997.
- Janssen, B.-J. & Gardner, R. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*, v.14, p.61-72, 1990.
- Jones, J. D. & Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, v.444, p.323-329, 2006.
- Kaku, H.; Nishizawa, Y.; Ishii-Minami, N.; Akimoto-Tomiya, C.; Dohmae, N.; Takio, K.; Minami, E.; Shibuya, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.103, p.11086-11091, 2006.
- Kamoun, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual review of Phytopathology*, v.44, p.41-60, 2006.
- Kamoun, S. The secretome of plant-associated fungi and oomycetes. In: Deising, H. & Essey, K. *The Mycota*. New York: Springer, 2009, p.173-180.
- Kanneganti, T.D.; Huitema, E.; Cakir, C.; Kamoun, S. Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nep1-like protein PiNPP1.1 and INF1 elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, p.854-863, 2006.
- Kapila, J.; DeRycke, R.; VanMontagu, M.; Angenon, G. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, v.122, p.101-108, 1997.

Karimi, M.; Inze, D.; Depicker, A. GATEWAYTM vectors for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, v.7, p.193–195, 2002.

Kelley, B.S.; Lee, S-J.; Damasceno, C.M.B.; Chakravarthy, S.; Kim, B-D.; Martin, G.B.; Rose, J.K.C. A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *The Plant Journal*, v.62, p.357-366, 2010.

Keogh, R.C.; Deverall, B.J.; Mcleod, S. Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. *Transactions of the British Mycological Society*, v.74, p.329–333, 1980.

Kjemtrup, S.; Nimchuk, Z. & Dangl, J.L. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: Bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, p.73–78, 2000.

Koch E. & Hoppe H.H. Effect of light on uredospore germination and germ tube growth of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *Journal of Phytopathology*, v.119, p.64-74, 1987.

Koch, E.; Ebrahimnesbat, F.; Hoppe, H.H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. *Phytopathol. Z.*, v.106, p.302–320, 1983.

Koga, L.J.; Canteri, M.G.; Calvo, E.S.; Unfried, J.R.; Garcia, A.; Harada, A.; Kiihl, R.A. de S. Análise multivariada dos componentes da resistência à ferrugem-asiática em genótipos de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.10, p.1277-1286, 2008.

Lacomme, C. & Santa Cruz, S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.96, p.7956–7961, 1999.

Laperuta, L.D.C.; Arias, C.A.A.; Ribeiro, A.S.; Rachid, B.F.; Pierozzi, P.H.B.; Toledo, J.F.F.; Pípolo, A.E.; Carneiro, G.E.S. New genes conferring resistance to Asian Soybean Rust: allelic testing for the *Rpp2* and *Rpp4* loci. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.12, p.1741-1747, 2008.

Lee, S-J.; Kelley, B. S.; Damasceno, C. M. B.; John, B. S.; Kim, B.-S.; Kim, B.-D.; Rose, J. K. C. A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, p.1368-1377, 2006.

Li, S. Reaction of soybean rust-resistant lines identified in Paraguay to Mississippi isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Crop science*, v.49, p.887-894, 2009.

Link, T. I. & Voegelé, R. T. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Molecular Plant Pathology*, v.9, n.1, p.59–66, 2008.

Loehrer, M.; Langenbach, C.; Goellner, K.; Conrath, U.; Schaffrath, U. Characterization of nonhost resistance of *Arabidopsis* to the Asian soybean rust. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.21, n.11, p.1421-1430, 2008.

Luderer, R.; Takken, F. L. W.; De Wit, P. J. G. M.; Joosten, M. H. A. J. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology*, v.45, p.875–884, 2002.

Marti, M.; Good, R.T.; Rug, M.; Knuepfer, E.; Cowman, A.F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, v.306, p.1930–1933, 2004.

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

McLean, R.J & Byth, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.31, p.951-956, 1980.

Mendgen, K. & Hahn, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, v.7, p.352-356, 2002.

Mestre, P.; Brigneti, G.; Baulcombe, D.C. An Ry-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from potato virus Y. *The Plant Journal*, v.23, p.653–661, 2000.

Miles, M. R., Frederick, R. D., and Hartman, G. L. 2006. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Health Progress* (2006), doi:10.1094.PHP-2006=0104-01-RS.

Miles, M.R.; Morel, W.; Ray, J.D.; Smith, J.R.; Frederick, R.D.; Hartman, G.L. Adult plant evaluation of soybean accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in the field and greenhouse in Paraguay. *Plant Disease*, v.92, n.1, p.96-105, 2008.

Mims, C.W.; Rodriguez-Lothar, C.; Richardson, E.A. Ultrastructure of the host-pathogen interface in daylily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma*, v.219, p.221–226, 2002.

Miya, A.; Albert, P.; Shinya, T.; Desaki, Y.; Ichimura, K.; Shirasu, K.; Narusaka, Y.; Kawakami, N.; Kaku, H.; Shibuya, N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.104, p.19613-19618, 2007.

Oliveira, A.C.B. de; Godoy, C.V.; Martins, M.C. Avaliação da tolerância de cultivares de soja à ferrugem asiática no Oeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.658-662, 2005.

Ono, Y.; Buritica, P.; Hennen, J.F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. *Mycological Research*, v.96, p.825-850, 1992.

Orbach, M.J.; Farrall, L.; Sweigard, J.A.; Chumley, F.G.; Valent, B. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell*, v.12, p.2019–2032, 2000.

Pemberton, C.L. & Salmond, G.P.C. The Nep1-like proteins: a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology*, v.5, p.353-359, 2004.

Pham, T.A.; Hill, C.B.; Miles, M.R.; Nguyen, B.T.; Vu, T.T.; Vuong, T.D.; VanToai, T.T.; Nguyen, H.T.; Hartman, G.L. Evaluation of soybean for resistance to soybean rust in Vietnam. *Field Crops Research*, v.117, p.131-138, 2010.

Pham, T.A.; Miles, M.R.; Frederick, R.D.; Hill, C.B.; Hartman, G.L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease*, v.93, p.224–228, 2009.

Pinheiro, G.L.; Marques, C.S.; Costa, M.D.B.L.; Reis, P.A.B.; Alves, M.S.; Carvalho, C.M.; Fietto, L.G.; Fontes, E.P.B. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*, v.444, p.10-23, 2009.

Programa Nacional de Controle da Ferrugem Asiática da Soja (PNCFS). Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/uploads/2010/04/PNCFS-IN-02-2007.pdf>. Acesso em 20 agosto 2010.

Qutob, D.; Kamoun, S.; Gijzen, M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant Journal*, v.32, p.361–373, 2002.

Rapoport, T.A. 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, v.258, p.931–936, 1992.

Ray, J.D.; Morel, W.; Smith, J.R.; Frederick, R.D.; Miles, M.R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. *Theoretical and applied genetics*, v.119, p.271-280, 2009.

Rep, M. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*, v.253, p.19-27, 2005.

Ridout, C. J.; Skamnioti, P.; Porritt, O.; Sacristan, S.; Jones, J. D.; Brown, J. K. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *Plant Cell*, v.18, p.2402-2414, 2006.

Saksirirat, W. & Hoppe, H.H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *Journal of Phytopathology*, v.132, p.339-342, 1991.

Sanford, J.; Smith, F.D.; Russel, J. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, v.217, p.483-509, 1993.

Santos-Rosa, M.; Poutaraud, A.; Merdinoglu, D.; Mestre, P. Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant Cell Reports*, v.27, p.1053–1063, 2008.

Schneider, R.W.; Hollier, C.A.; Whitam, H.K.; Palm, M.E.; McKemy, J.M.; Hernández, J.R.; Levy, L.; DeVries-Paterson, R. First Report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United states. *Plant Disease*, v.89, p.774, 2005.

Scholthof, H.B.; Scholthof, K.B.; Jackson, A. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, p.299-323, 1996.

- Scofield, S.R.; Tobias, C.M.; Rathjen, J.P.; Chang, J.H.; Lavelle, D.T.; Michelmore, R.W.; Staskawicz, B.J. Molecular basis of gene for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, v.274, p.2063–2065, 1996.
- Sessa, G.; D'Ascenzo, M.; Martin, G.B. Thr38 and Ser98 are Pto autophosphorylation sites required for the AvrPto-Pto-mediated hypersensitive response. *The EMBO Journal*, v.19, n.10, p.2257-2269, 2000.
- Shabab, M.; Shindo, T.; Gu, C.; Kaschani, F.; Pansuriya, T. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell*, v.20, p.1169–83, 2008.
- Shaw, M. The physiology and host-parasite relations of the rusts. *Annual Review of Phytopathology*, v.1, p.259-294, 1963.
- Shen, Z. & Jacobs-Lorena, M. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, v.48, p.341-347, 1999.
- Sinclair, J.B. & Hartman, G.L. Soybean rust. In: Hartman, G.L.; Sinclair, J.B.; Rupe, J.C. Compendium of soybean diseases. 4th ed. St Paul: American Phytopathological Society, 1999, p.3-4.
- Sohn, K.H.; Lei, R.; Nemri, A.; Jones, J.D.G. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, v.19, p.4077–4090, 2007.
- Staskawicz, B. J.; Dahlbeck, D.; Keen, N. T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* determines race-specific incompatibility on glycine max (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.81, p.6024-6028, 1984.
- Tang, X.; Frederick, R.D.; Zhou, J.; Halterman, D.A.; Jia, Y.; Martin, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. *Science*, v.274, p.2060-2063, 1996.
- Tatara, Y.; Yoshida, T.; Ichishima, E. A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2- α -Manosidase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.69, n.11, p.2101-2108, 2005.
- Tatsumi, H.; Murakami, S.; Tsuji, R.F.; Ishida, Y.; Murakami, K.; Masaki, A.; Kawabe, H.; Arimura, H.; Nakano, E.; Motai, H. Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. *Molecular and General Genetics*, v.228, p.97–103, 1991.
- Tian, M.; Huitema, E.; da Cunha, L., Torto-Alalibo, T.; Kamoun, S. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *The Journal of Biological Chemistry*, v.279, p.26370–26377, 2004.
- Torisky, R.S.; Kovacs, L.; Avdiushko, S.; Newman, J.D.; Hunt, A.G.; Collins, G.B. Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Reports*, v.17, p.102–108, 1997.
- Torto, T. A.; Li, S. A.; Styer, A.; Huitema, E.; Testa, A.; Gow, N. A. R.; van West, P.; Kamoun, S. EST mining and functional expression assays identify extracellular

effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research*, v.13, p.1675–1685, 2003.

Tremblay, A.; Li, S.; Scheffler, B.E.; Matthews, B.F. Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2009), doi: 10.1016/j.pmpp.2009.06.001.

Twizeyimana, M.; Ojiambo, P.S.; Ikotun, T.; Ladipo, J.L.; Hartman, G.L.; Bandyopadhyay, R. Evaluation of soybean germplasm for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria. *Plant Disease*, v.92, p.947-952, 2008.

Van Den Burg, H. A.; Harrison, S. J.; Joosten, M. H. A. J.; Vervoort, J.; De Wit, P. J. G. M. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, p.1420–1430, 2006.

van den Burg, H.A.; Westerink, N.; Francoijs, K.J.; Roth, R.; Woestenenk, E.; Boeren, S.; de Wit, P.J.; Joosten, M.H.; Vervoort, J. Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.27340–27346, 2003.

Van der Hoorn, R.A.L.; Laurent, F.; Roth, R.; De Wit, P.J.G.M. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, n.4, p.439-446, 2000.

van Kan, J. A. L.; Van Den Ackerveken, G. F. J. M.; De Wit, P. J. G. M. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.4, p.52–59, 1991.

Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'Connor-Sanchez, A.; Willmitzer, L.; Rocha-Sosa, M. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics*, v.220, p.245-250, 1990.

Voegele, R.T.; Hahn, M.; Mendgen, K. The Uredinales: cytology, biochemistry and molecular biology. In: Deising, H. & Essey, K. *The Mycota*. New York: Springer, 2009, p.69-98.

Voegele, R.T & Mendgen, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, v.159, p.93-100, 2003.

von Heijne, G. Signal sequences. The limits of variation. *Journal Molecular of Biology*, v.184, p.99–105, 1985.

Yang, X.B.; Tschanz, A.T.; Dowler, W.M.; Wang, T.C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Phytopathology*, v. 81, n.11, p. 1420-1426, 1991.

Yorinori, J. T.; Lazzarotto, J. J. Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América Latina, *Embrapa*, ISSN 1516-781-X, 2004.

Yorinori, J.T.; Pavia, W.M.; Frederick, R.D.; Costamilan, L.M.; Bertagnolli, P.F.; Hartman, G.L.; Godoy, C.; J. Nunes, Jr. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*, v.89, p.675-677, 2005.

Webb C.A. & Fellers J.P. Cereal rust fungi genomics and the pursuit of virulence and avirulence factors. *Minireview. FEMS Microbiology Letters*, v.1, p.1-7, 2006.

Whisson, S. C.; Boevink, P. C.; Moleleki, L.; Avrova, A. O.; Morales, J. G.; Gilroy, E. M.; Armstrong, M. R.; Grouffaud, S.; van West, P.; Chapman, S. *et al.*: A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, v.450, p.115-118, 2007.

Williamson, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical Journal*, v.297, p.249-260, 1994.

Win, J.; Morgan, W.; Bos, J.; Krasileva, K.V.; Cano, L.M.; Chaparro-Garcia, A.; Ammar, R.; Staskawicz, B.J.; Kamoun, S. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell*, v.19, p.2349–2369, 2007.

Wroblewski, T.; Tomczak, A.; Michelmore, R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, v.3, p.259–273, 2005.

Zaramela, L.S. Identificação de genes que codificam proteínas secretadas pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem da soja. Viçosa, MG, 31p. Monografia – Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Zou, J.M & Chai, J. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current Opinion of Microbiology*, v.11, p.179-185, 2008.