

FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS HOMÓLOGAS A
GENES DE RESPOSTA À RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM SOJA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002**

FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS HOMÓLOGAS A GENES
DE RESPOSTA À RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM SOJA**

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

APROVADA: 11 de Novembro de 2002.

**Dra. Marta F. Martins Guimarães
(Conselheira)**

**Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)**

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Maurílio Alves Moreira

**Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)**

**Aos meus pais, Fátima e Manoel,
Aos meus irmãos,
À minha tia Geralda.**

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo durante o meu curso de mestrado e ao à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante a graduação, quando era participante do Programa Especial de Treinamento.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do Curso e pela minha formação acadêmica e; e em especial, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária BIOAGRO, pela ótimas condições de trabalho.

Aos meus familiares pela compreensão nos momentos de ausência e confiança em mim depositada.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, pela amizade e pela confiança demonstradas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Elza Fernandes de Araújo, pelos conselhos e exemplo de dedicação.

À Doutora Marta Fonseca Martins Guimarães por todos conselhos, amizade, confiança e apoio nos momentos difíceis. E ainda pelos ensinamentos iniciais das técnicas de manipulação de ácidos nucleicos.

Aos Professores Maurílio Alves Moreira e Wagner Campos Otoni por terem aceito participar em minha banca examinadora.

Ao Professor Lúcio Antônio de Oliveira Campos, pela amizade e grande contribuição em minha formação durante minha participação no PET/BIO.

À Gerda Kilger e Bráulia Caetano pelos primeiros passos na pesquisa.

À minha grande amiga Poli, pela dedicação, pela amizade, pela convivência e pelo apoio constante.

Às gatinhas Angel e Yara pela amizade e momentos de descontração.

Às “oitocentas e tantas”: Tati, Ana, Silvinha, Érika, Hélia, Angel e Poli inesquecíveis.

Ao meu grande amigo Marcos Antônio Soares pelo carinho, amizade e convivência.

Ao meu querido Francisco Eduardo de Paula pelo apoio e carinho.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas I e II: Fábio, Vagner, Ivan, Ana Lília, Márcia, Rita, Pedro, Vilmar, Gerardo, Maria Luiza, Sebastião, Valéria, Inês, Newton, Lucimara, Taís e Chico pela amizade e convivência.

Em especial aos colegas de Laboratório Seq-DNA: Cândida, Andréia, Marcio Antônio, Márcio Mendes (pelas idéias geniais principalmente), Bia e Ricardo pela amizade e carinho; e também àqueles que estão distante Cynthia, Abelmon, Valéria e Jay.

Aos amigos do Laboratório Genética Molecular de Microrganismos, em especial a Andréa e Denise, pela ajuda, sugestões e disponibilização de equipamentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários, pela disponibilização de equipamentos e amizade.

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), especialmente a Aloísio, Gláucea, Sandra, Fausto, Aline, Alessandra, Parda e Expedito, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários e colegas do Curso de Genética e Melhoramento, pela colaboração, em especial às secretárias Rita e Conceição.

A todos os amigos e pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a conclusão de mais esta etapa da minha formação profissional.

BIOGRAFIA

Francismar Corrêa Marcelino, filha de Manoel Ferreira Marcelino e Fátima de Lurdes Corrêa Marcelino, nasceu em 12 de fevereiro de 1977, em Carmo, Rio de Janeiro.

Em 1996 iniciou o curso superior na UFV, onde em 12 de outubro de 2000 concluiu o Bacharelado e a Licenciatura em Ciências Biológicas. Durante a graduação participou do Programa Especial de Treinamento – PET (1997/00), além de desenvolver atividades de Iniciação Científica nas linhas de pesquisa Imunologia de Hematozoários (1997/98), e Genética Molecular de Plantas(1998/00), ambas no BIOAGRO/UFV.

Em outubro 2000, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em 11 novembro de 2002.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A Resposta de Resistência	4
2.2. Estrutura dos Genes de Resistência.....	9
2.3. Clonagem e Classificação dos Genes de Resistência.....	13
2.4. Caracterização de Genes Requeridos na Resposta de Defesa em Plantas.....	16
2.5. Métodos de Clonagem.....	20
2.6. Estratégias de Melhoramento Genético Baseadas no Isolamento de Genes <i>R</i> , nos Mecanismos e Genes Envolvidos na Resposta de Resistência.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Material Genético.....	25
3.2. Extração de RNA Total.....	25
3.3. Construção do Banco de cDNA.....	26
3.3.1. Extração de mRNA poliA ⁺	27
3.3.2. Síntese do cDNA.....	28
3.3.3. Ligação dos Adaptadores.....	29
3.3.4. Ligação das Moléculas de cDNA no Vetor Uni-ZAP XR e Empacotamento.....	31
3.3.5. Titulação e Amplificação da Biblioteca.....	33
3.4. “Screening” da Biblioteca de cDNA Usando a Técnica de PCR.....	35
3.5. Extração de DNA dos Bacteriófagos Recombinantes.....	37
3.6. Marcação e Obtenção da Sonda	38

3.7. "Dot Blotting"	39
3.8. "Screening" da Biblioteca de cDNA	40
3.9. Excisão <i>in vivo</i> dos Fagomídeos pBluescript do Vetor Uni-ZAP XR	42
3.10. Extração de DNA Plasmidial	43
3.11. Seqüenciamento do DNA.....	44
3.12 Reações de Amplificação por PCR.....	45
3.13. RT-PCR	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5. RESUMO E CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

MARCELINO, Francismar Corrêa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2002. **Isolamento e caracterização de sequências homólogas a genes de resposta à resistência a doenças em soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Marta Fonseca Martins Guimarães.

A análise do genoma de variedades de soja por hibridização com sondas RFLP (*Random Fragment Length Polymorphism*) revelou um grande número de bandas monomórficas e de algumas bandas polimórficas de pequeno número de cópias, sendo estas últimas utilizadas normalmente na construção de mapas de ligação. Dentre as sondas que apresentaram polimorfismo, algumas revelaram um grande número de bandas de DNA que eram altamente polimórficas entre diferentes cultivares, mapeando regiões hipervariáveis do genoma. Neste presente trabalho um fragmento de 295 pb (A5309-295), oriundo da amplificação de uma destas sondas (A53-09) com “primers” específicos e que apresenta homologia com genes de resistência a doenças em plantas, foi utilizado para escrutinar uma biblioteca de cDNA de soja. Quatro clones positivos foram obtidos e denominados A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54 foram isolados. Estes clones, com 1,4, 1,7, 2,0 e 1,6 kb, respectivamente, foram seqüenciados e as seqüências de aminoácidos predita de cada um dos clones foram comparadas com outras depositadas no “GenBank”. O clone A5309-28 apresentou homologia com uma proteína de interação com bomba de prótons de *Arabidopsis*

thaliana, e poderia atuar na resposta de defesa das plantas. Durante a resposta de defesa estas enzimas mediam o influxo de prótons através da membrana após a elicitação celular, levando à alcalinização do meio extracelular e acidificação do citosol. Estes são passos importantes durante a resposta de defesa. O clone A5309-41 apresentou homologia com um transportador de membrana dependente de ATP (transportador ABC) de *Populus nigra*. Estes transportadores estão freqüentemente envolvidos nos processos de detoxificação durante a resposta de resistência. O clone A5309-48 apresentou homologia com uma proteína lipoxigenase expressa em folhas de tabaco após indução por jasmonato, e poderia participar na resposta de resistência por gerar moléculas sinalizadoras como ácido jasmônico, metil-jasmonato ou peróxidos lipídicos, oriundas da peroxidação lipídica, ou ainda pela formação de metabólitos secundários que podem inibir a proliferação do patógeno. O clone A5309-54 apresentou homologia com a proteína cinase PK12, membro da família LAMMER cinases, expressa em folhas de tabaco após indução por etileno. Para determinar se os quatro clones são expressos, “primers” que flanqueiam regiões específicas de cada clone foram construídos e utilizados em um RT-PCR (reverse transcription PCR). Em todos os órgãos analisados (raiz, caule, folha e semente) existem seqüências transcritas similares aos clones isolados neste trabalho. A homologia entre a o fragmento utilizado como sonda (A5309-295) e os quatro clones positivos foi analisada pelo alinhamento entre suas seqüências de nucleotídeos. Todos os quatro clones apresentaram homologia superior a 30% quando comparados com a sonda A5309-295. A seqüência predita de aminoácidos do fragmento utilizado como sonda (A5309-295) contém uma ORF de 56 aminoácidos e apresenta dois sítios conservados: um sítio de meristoilação, indicando uma provável localização de membrana, e um sítio de fosforilação por uma proteína cinase caseína II. Todos os clones isolados também apresentam um sítio de fosforilação por uma proteína cinase C e por uma proteína cinase caseína. Exceto o clone A5309-28, todos os outros isolados também apresentam sítio de meristoilação. A5309-28 apresenta ainda uma região rica em lisina, enquanto o clone A5309-48 um domínio transmembrana. A potencial presença de tais domínios nas seqüências preditas de aminoácidos dos clones positivos e do fragmento utilizado como sonda (A5309-295), indica uma provável presença de regiões similares tanto na seqüência

protéica, como de DNA, que permitam a interação dessas proteínas com a membrana plasmática, além de justificar o isolamento dos clones do banco de cDNA.

ABSTRACT

MARCELINO, Francismar Corrêa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, November, 2002. **Isolation and characterization of sequences homologous to disease resistance response genes in soybean.** Advisor: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Marta Fonseca Martins Guimarães.

Analysis of the cultivated soybean genome by hybridization with RFLP (Random Fragment Length Polymorphism) probes revealed a great number of monomorphic, and some polymorphic loci, with a low copy number in the genome. The latter can be used for the construction of linkage maps. There is also another class of probes that reveals hypervariable and high copy number regions. In this work a fragment of 295 base pairs (A5309-295), part of probe A53-09, which has been shown to be homologous to plant disease resistance genes, was used to screen a soybean cDNA library. Four positive clones named A5309-28, A5309-41, A5309-48 and A5309-54 were isolated. These clones, with 1.4, 1.7, 2.0, and 1.6 kilobase pairs, respectively, were sequenced and the corresponding deduced amino acid sequences were compared to those deposited in the GenBank. Clone A5309-28 was homologous to a proton ATPase from *Arabidopsis thaliana*, and it could participate in the defense response in the plant. During the defense response these enzymes mediate the influx of protons across the membrane leading to the alcalinization of the extracellular medium and acidification of the cytosol. These are important steps during the defense response. Clone A5309-41 was homologous to an ATP-dependent membrane transporter (ABC transporter) from

Populus nigra. These transporters are often involved in the detoxication process during the resistance response. Clone A5309-48 was homologous to the lipoxygenase (LOX) enzyme which is expressed in tobacco leaves after induction by jasmonate. These enzymes also participate in the resistance response by taking part on a route leading the production of jasmonic acid, methyl jasmonate or lipid peroxides, or by producing secondary metabolites that may inhibit the pathogen proliferation. Clone A5309-54 was homologous to the protein kinase PK12, a member of the LAMMER family, which is expressed in tobacco leaves induced by ethylene. To determine if the four clones isolated were expressed, primers flanking specific parts of each clone were designed and used in reverse transcription PCR (RT-PCR) reactions. In all organs tested (root, stem, leaves, and seeds) expressed sequences were detected. The sequence relationship between the 295 bp fragment (probe A5309-295), and the four positive clones was analyzed and homologies greater than 30% were found.

The clone from which the probe A5309-295 was isolated contains an ORF that potentially codes for an amino acid sequence with 56 residues with two conserved sites: one for myristoylation, which is indicative of membrane localization, and a phosphorylation site for protein kinase C and casein kinase. All four clones, with the exception of clone A5309-28, also presented the myristoylation site. In addition, clone A5309-28 presented a lysine rich region, and clone A5309-48 presented a transmembrane domain.

The presence of these domains in the predicted amino acid sequences of the positive clones and of probe A5309-295 indicates that these putative proteins can interact with the plasma membrane, and the presence of these common domains could also help to explain why these clones hybridized with this specific probe.

1. INTRODUÇÃO

O número de doenças causadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus na soja (*Glycine max* L. Merrill) aumenta com a expansão da cultura para novas áreas. As doenças responsáveis pelas maiores perdas têm sido o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis), a antracnose (*Colletotrichum dematium* var. Truncata), a mancha parda (*Septoria glycines*), o crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), a mancha “olho-de-rã” (*C. sojina*), a seca da haste e da vagem (*Phomopsis sojae* e outras espécies), a podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*), nematóides de galhas (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*) e nematóide do cisto (*Heterodera glycines*). Avaliações das perdas têm mostrado que somente as doenças de final de ciclo, causadas por *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*, são capazes de reduzir o rendimento em mais de 20% na maioria das variedades (ARANTES & SOUZA, 1993). Para o Brasil isso representa um prejuízo anual de cerca de 20 milhões de dólares. Entre os anos de 1988 e 1990 houve uma perda de 9% na produção mundial de soja devido ao ataque de patógenos, o que equivale a uma cifra de 3,2 bilhões de dólares (<http://www.conabe.gov.br>).

O estudo dos mecanismos de resistência de plantas a doenças e da inter-relação planta-patógeno, com auxílio das técnicas de Biologia Molecular, pode

fornecer importantes respostas para o desenvolvimento de cultivares resistentes e com alta produtividade. A resistência genética tem sido eficaz para o controle da mancha “olho-de-rã”, do cancro da haste e do nematóide de cisto da soja, de modo que a elucidação dos mecanismos de resistência e da interação planta-patógeno se tornam fundamentais.

A grande parte das respostas efetivas de resistência a patógenos está vinculada à presença de genes de resistência (genes *R*) nas plantas. Os produtos de expressão dos genes *R* atuam como receptores diretos ou indiretos a fatores de avirulência (*Avr*) específicos dos patógenos (FLOR, 1971). Os genes *R*, uma vez ativados, desencadeiam cascatas de transdução de sinal que culminam com o fenótipo de resistência. Atualmente mais de 20 genes *R* com especificidade de reconhecimento para genes *Avr* definidos já foram clonados (BAKER et al., 1997; BENT, 1996; MARTIN, 1999; MELCHERS & STUIVER, 2000). A clonagem de genes *R* abre caminho para diversas estratégias de obtenção de plantas resistentes a patógenos e seleção baseada em marcadores moleculares. Um determinado gene *R* de uma espécie pode ser usado para “engenheirar” uma nova especificidade de resistência em uma variedade economicamente importante. A transferência de genes *R*, dentro de famílias de plantas, tem apresentado sucesso, como foi o caso do gene *Cf9* de tomate que mostrou funcionalidade em batata e tabaco (HAMMOND-KOSACK et al., 1998), no entanto, isto ainda não foi possível entre diferentes famílias, talvez devido à ausência ou incompatibilidade de componentes de sinalização ou reconhecimento. Dessa maneira outros genes que apresentam importante papel na cascata de eventos que se seguem ao reconhecimento do fator *Avr* pelo produto do gene *R* têm sido alvo de interesse. Dois desses genes foram clonados, *NDR1* e *EDS1* (CENTURY et al., 1997; FALK et al., 1999). Plantas de *Arabidopsis* sp. mutantes para esses genes têm a resistência afetada tanto para patógenos bacterianos como de fungos.

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização de seqüências expressas em soja, variedade FT-Cristalina, homólogas a genes envolvidos na resposta de resistência a doenças, visando um maior entendimento das bases moleculares da resistência a doenças nessa leguminosa, e também o

emprego futuro de novas alternativas no desenvolvimento de variedades resistentes de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Resposta de Resistência

Os agentes fitopatogênicos incluem vírus, micoplasmas, bactérias, fungos e nematóides. Devido ao processo contínuo de co-evolução com os patógenos as plantas desenvolveram mecanismos de resistência que podem ser constitutivos ou induzidos; assim, apesar da vasta gama de fitopatógenos, a resistência é regra e a susceptibilidade, exceção.

A infecção pode não ocorrer devido à presença de barreiras físicas (parede celular e cutícula), produção de compostos químicos (substâncias fenólicas e alcalóides), presença de metabólitos secundários pré-formados com atividade antimicrobiana (saponinas e glucosinolatos), ou pelo fato da planta não apresentar os requerimentos básicos para o modo do patógeno, ou seja, ser uma planta não-hospedeira. Ou ainda, devido ao reconhecimento do patógeno pela planta, o que leva à indução da resposta de defesa controlada por inúmeros genes envolvidos desde a detecção do patógeno até a resposta final (JOHAL et al., 1995).

O sucesso na infecção depende também do patógeno apresentar os requisitos mínimos para infecção, ou seja, possuir os fatores de compatibilidade básica, além de condições ambientais favoráveis (BUCHANAN et al., 2000).

De acordo com a teoria da interação gene-a-gene (FLOR, 1971), a indução da resposta de defesa é iniciada pelo reconhecimento por parte da planta hospedeira, de moléculas sinalizadoras específicas (elicitores), codificadas por genes de avirulência (*Avr*) do patógeno. As proteínas que reconhecem os elicitores são codificadas por genes de resistência (*R*) correspondentes, presentes nas células vegetais. O reconhecimento do elicitor leva a uma cascata de eventos de transdução de sinais que irá ativar genes da célula vegetal hospedeira, resultando em uma rápida resposta de defesa. Quando o patógeno não tem o correspondente gene *Avr* ele não é reconhecido pelo hospedeiro e, portanto, não ocorre indução dos mecanismos de defesa, ou esta ocorre de um modo bastante lento, o que possibilita o crescimento do patógeno e o desenvolvimento da doença. Este tipo de interação é dita incompatível e tem sido confirmada por meio de estudos da interação entre o tomateiro e o patógeno *Cladosporium fulvum*, na qual dois genes de avirulência, *Avr9* e *Avr4*, codificam peptídeos elicitores que induzem respostas de hipersensibilidade (HR) em plantas de tomate que apresentam os genes *R* correspondentes, *Cf-9* e *Cf-4*, respectivamente (JOOSTEN et al., 1997).

Entre as principais respostas de defesa estão: liberação de radicais livres, reforço da parede celular por lignificação e produção de calose, produção de compostos antimicrobianos (fitoalexinas e enzimas hidrolíticas), HR e indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (STASKAWICZ et al., 1995; KNOGGE, 1996).

A HR é uma das primeiras respostas contra o ataque do patógeno, e é caracterizada pela morte celular e tecidual no local da infecção, impedindo que a doença se espalhe pelo resto do organismo. HR parece estar relacionada com o reconhecimento entre o elicitor e o receptor na membrana, seguida da transdução de sinal que culmina com a indução dos genes de defesa, embora HR não seja obrigatória em todas as respostas de defesa. Durante a HR há a formação de substâncias reativas de oxigênio (ROS) devido a combustão oxidativa, alteração do potencial de membrana, no estado de fosforilação de proteínas e aumento da concentração de óxido nítrico (NO).

Dois principais modelos geradores de ROS têm sido propostos: um similar ao sistema NADPH oxidase de neutrófilos de mamíferos, e um segundo dependente de peroxidases presentes no apoplasto das células vegetais. Em ambos os modelos a interação receptor-ligante está acoplada com a abertura de canais de íons devido à interação direta com uma proteína G ou por meio da ação da adenilato ciclase. O influxo de Ca^{+2} ativaria diretamente, ou por meio de cinases dependente de Ca^{+2} (CDPK), uma proteína análoga à proteína NADPH oxidase de neutrófilos de mamíferos. Uma vez ativada, esta proteína seria capaz de promover a redução de uma molécula de oxigênio gerando radicais superóxidos (O_2^-) que seriam rapidamente convertidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da proteína superóxido dismutase (SOD) (BOLWELL, 1999). Uma proteína análoga a um dos componentes do sistema NADPH oxidase de neutrófilo de mamíferos, *gp91^{phox}*, já foi clonada em arroz e *Arabidopsis* (KELLER et al., 1998; TORRES et al., 1998). Ela foi denominada ATRBOH e apresenta sítio de ligação a Ca^{+2} , seis domínios transmembrana e sítios de ligação a FAD e NADPH situados na região carboxi terminal, provendo a conexão regulatória entre a detecção de proteínas de avirulência do patógeno e ativação do fluxo de íons na resposta de resistência. Uma cinase dependente de Ca^{+2} também foi identificada por ROMEIS et al. (2000) em cultivo de células de tabaco transgênico em suspensão, que expressava o gene *Cf-9* de tomate, após a elicitação com fluidos intercelulares contendo o fator de avirulência *Avr9*.

O sistema dependente de peroxidases é similar ao primeiro, no entanto, as proteínas peroxidases responsáveis pela produção de ROS estariam no apoplasto. Nesse modelo, a alcalinização do apoplasto é obrigatória, além da presença de agentes redutores nesta região (FALK et al., 1999).

Os radicais superóxido de oxigênio podem gerar radicais de hidroperóxil (HO_2^-) que são capazes de atravessar membranas tão eficientemente quanto os radicais de peróxido de hidrogênio, levando a danos celulares. Em condições apropriadas, H_2O_2 e radicais HO_2^- podem converter os ácidos linoléico, linolênico e araquidônico em peróxidos lipídicos, que atuam como moléculas sinalizadoras. O peróxido de hidrogênio poderia atuar ainda como substrato para peroxidação

lipídica, envolvendo lipoxigenases, levando à formação de precursores do ácido jasmônico, que também têm função sinalizadora.

Tais radicais poderiam induzir à morte das células hospedeiras no sítio de infecção, promover alterações estruturais da parede celular e induzir genes de defesa. A ativação dos genes que codificam as proteínas fenilalanina amônia liase (PAL) e aquelas envolvidas na cascata de MAP cinases por indução de peróxido de hidrogênio, já foram reportadas (LAMB & DIXON, 1997). A análise de mutantes que exibem HR na ausência de patógeno permitiu a identificação do gene *LSD1* em *Arabidopsis*, que é capaz responder ao acúmulo de radicais superóxido, regulando o mecanismo de apoptose nas células vegetais durante HR (DIETRICH et al., 1997).

O peróxido de hidrogênio desempenha, ainda, outros papéis de extrema importância na defesa. Contribui para o reforço da parede celular, auxilia na formação de precursores dos polímeros de lignina, promove o aumento da síntese de fitoalexinas antimicrobianas, por meio da biossíntese de propanóides ou flavonóides, e da atividade da 2-ácido benzóico hidroxilase (BA2-H), enzima que é requerida para a síntese de ácido salicílico (SA). O desbalanço do potencial redox causado por ROS pode ainda alterar o padrão de expressão gênica. Fatores de transcrição responsivos à variação do potencial redox já foram identificados em mamíferos. A estabilidade de alguns transcritos envolvidos na resposta de defesa também pode ser regulada pelo balanço redox (MEYER et al., 1993).

Concomitantemente à geração de ROS a síntese *de novo* de óxido nítrico (NO) é detectada no sítio de infecção. DURNER et al. (1998) demonstraram que a atividade da proteína óxido nítrico sintase (NOS) aumentou quatro a cinco vezes em folhas de tabaco após a infecção com o vírus do mosaico do tabaco. NO potencializa a indução de morte celular no sítio da infecção, provavelmente pela sua capacidade de inibir as enzimas catalase e peroxidase, as quais detoxificam os radicais H_2O_2 . NO também é capaz de ativar a proteína adenilato ciclase que, via AMP cíclico, induz à expressão de PAL.

A ativação de genes de defesa por ROS, NO e ácido salicílico ocorre sinergicamente não só no sítio da infecção, mas por toda a planta, levando à

resistência sistêmica adquirida (SAR) (DANGL et al., 1996; OUSBORN, 1996). ALVAREZ et al. (1998) demonstraram que a inoculação de *Arabidopsis* com um patógeno avirulento leva à combustão oxidativa não somente no sítio de infecção, mas discretas reações oxidativas foram detectadas em tecidos vizinhos, em células não infectadas.

SAR é efetiva para ampla gama de patógenos e requer ácido salicílico (SA), uma molécula fenólica sinalizadora (DEMPSEY, 1999). Durante esta resposta ocorre a expressão de diversas proteínas relacionadas à patogênese (PR), algumas das quais apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* e intensificam a resposta de resistência quando superexpressadas. O gene *NPR1*, clonado em *Arabidopsis* é requerido tanto para o estabelecimento de SAR como para expressão de PR-1, induzidas por SA (CAO et al., 1994).

Uma diferente resposta sistêmica foi descoberta recentemente em plantas que respondem a cepas não-patogênicas da bactéria colonizadora de raízes *Pseudomonas fluorescens*. Esta tem sido referida como Resistência Sistêmica Induzida (ISR) e também é efetiva para múltiplos patógenos (McDOWELL & DANGL, 2000; PIETERSE, 1998). ISR é independente de SA e não está associada com a ativação da expressão de PR-1, porém requer a operação das rotas sinalizadoras que respondem ao ácido jasmônico (JA) e etileno. Embora independente de SA, ISR requer a expressão do gene *NPR1*, sugerindo que este gene tem um papel basal nas respostas sistêmicas de defesa das plantas. *NPR1* apresenta um sinal de localização nuclear (NLS) e parece ser capaz de interagir com elementos responsivos a SA nas regiões promotoras dos genes relacionados com a patogênese.

Etileno e JA são moléculas sinalizadoras envolvidas na resposta de defesa a estresses bióticos e abióticos. Induzem à expressão de compostos antimicrobianos não induzidos por SA. Acredita-se que estas moléculas atuem em uma cascata antagonista à cascata envolvendo SA, embora possa haver cruzamento entre estas duas rotas de sinalização (DONG, 1998). O papel destas duas moléculas nas repostas de defesa a patógenos em plantas ainda não está muito bem esclarecido.

Um supressor de *NPR1*, denominado *SS1*, foi identificado mais recentemente, e demonstrou-se que nos duplos-mutantes (*npr1-ss1*) há expressão constitutiva de *PDF1.2*, um gene marcador para a rota dependente de JA, de maneira dependente de SA, o que leva a uma nova interpretação destas rotas de sinalização, ou seja, que os processos dependentes de SA podem ser desacoplados do gene *NPR1* e que haja interação entre as duas rotas (SHAH et al., 1999; FEYS, 2000). Também, de maneira intrigante, o gene marcador *PDF1.2* da rota de JA não é expresso durante a ISR, indicando um desvio na rota para expressão dessa defensina.

A elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa em plantas, bem como a clonagem de diferentes genes envolvidos desde a indução até a resposta final ao ataque de patógenos, irão permitir que programas de melhoramento genético futuros possam desenvolver variedades resistentes economicamente importantes.

2.2. Estrutura dos Genes de Resistência

Análises de seqüência e dos produtos protéicos dos genes *R* demonstraram que estes apresentam alguns domínios estruturais conservados: cinase serina-treonina, regiões ricas em leucina (LRR), sítios de ligação de nucleotídeos (NBS ou NBS-ARC), zíper de leucina (LZ), atualmente designado “coiled coils” (CC), e sinal ancoradouro para inserção na membrana. A partir dessa informação podem-se fazer inferências ligando a estrutura dos domínios e as prováveis funções às quais eles estão relacionados.

Com a clonagem do gene *Pto* foi possível perceber a importância dos eventos de transdução de sinal mediados por cinases na resistência a doenças em plantas (MARTIN et al., 1993). Esse gene codifica uma proteína cinase do tipo serina/treonina.

Os dados experimentais gerados até hoje indicam que a proteína *Pto* participa de um complexo protéico, junto com *Prf*, ancorado na membrana que

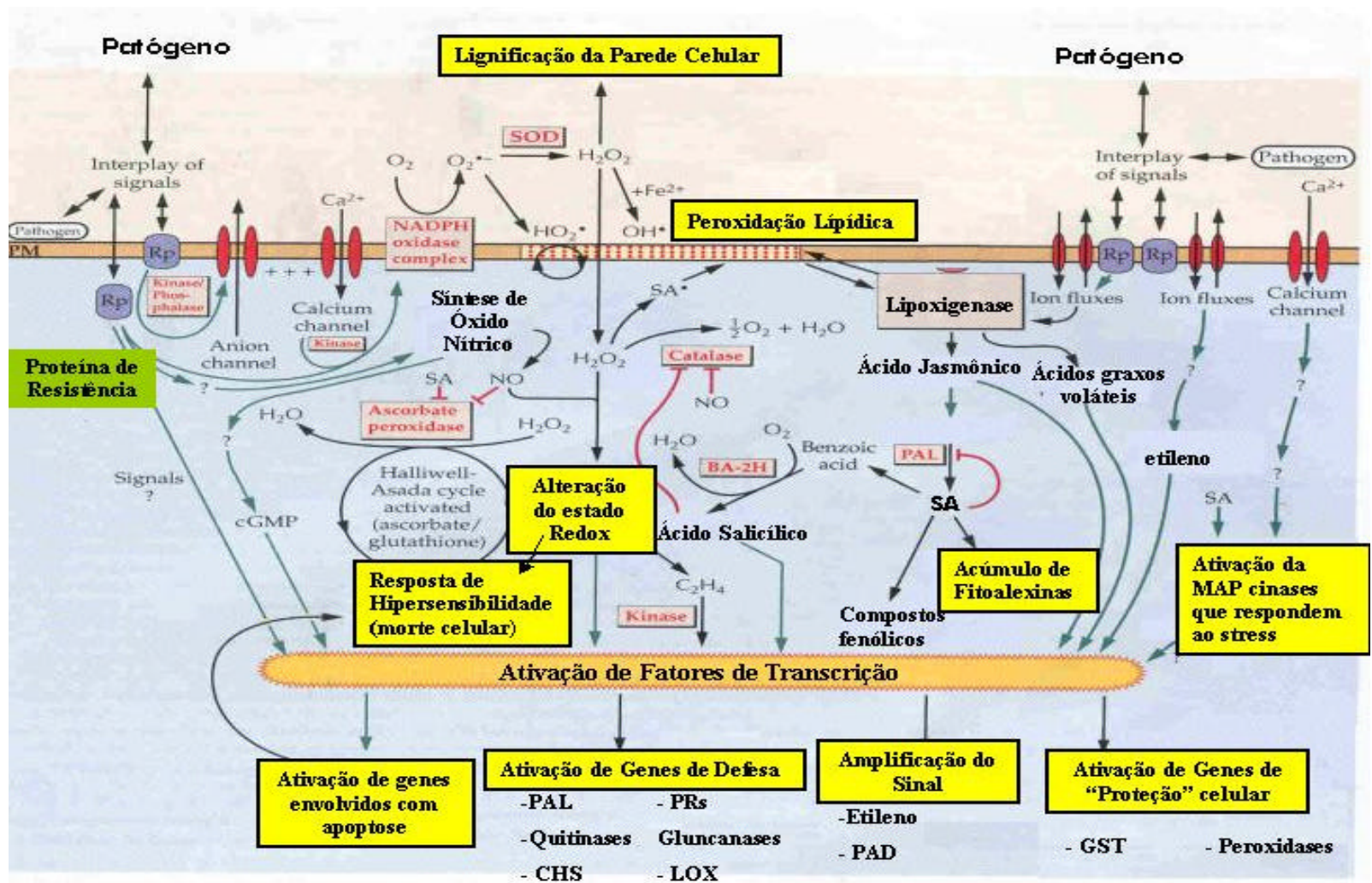


Figura 1 - Resposta de defesa das plantas a patógenos. Fonte: BUCHANAM (2000).

reconhece e interage diretamente com o elicitor *Avrpto* (TANG et al.,1996). Após sua ativação *Pto* é capaz de sofrer autofosforilação e interagir com a cinase *Pti1*, e com os fatores de transcrição *Pti4*, 5 e 6, que possuem um domínio de ligação a regiões promotoras altamente conservado nos genes que codificam proteínas relacionados com a patogênese. Tanto *Pto* como *Pti1* podem estar envolvidos na ativação destes fatores de transcrição por fosforilação.

A alteração do estado de fosforilação é um mecanismo bastante comum nos seres vivos, que o usam para controlar a atividade de proteínas. Espera-se, portanto, que mais genes *R* que tenham esse motivo estrutural sejam clonados nos próximos anos. Recentemente, SWIDERSKI & INNES (2001) clonaram o gene *PBS1* em *Arabidopsis thaliana*, que codifica uma cinase serina/treonina que parece ser funcionalmente distinta de *Pto*. O gene confere resistência a genótipos de *P. syringae* que expressam o fator de avirulência *AvrPphB*.

O domínio LRR contém cerca de 24 repetições de leucina ou outros resíduos hidrofóbicos em intervalos regulares e podem conter resíduos de prolina e asparagina espaçados regularmente. Esses domínios em proteínas de levedura, *Drosophila*, humanos e outras espécies têm sido envolvidos na mediação de interações proteína-proteína. Alguns exemplos incluem interações entre componentes intracelulares de uma cascata de transdução de sinal e ligação de hormônios peptídicos e receptores transmembrana. Recentemente, foi obtida evidência da interação entre uma proteína NBS-LRR, a codificada pelo gene *R Pita* de arroz, e o produto de um gene *Avr*, *Avr-Pita* (JIA et al., 2000). A importância desses domínios LRR foi demonstrada em experimentos com alelos mutantes de *RPS2* e *RPM1* que não eram funcionais devido à troca de um único aminoácido dentro da região LRR (BENT et al., 1994; MINDRINOS et al., 1994; GRANT et al., 1995). O papel do domínio LRR na sinalização nas respostas de defesa também já foi demonstrado. A substituição da região LRR do gene *Mi-1.2* de tomate pela região LRR do alelo *Mi-1.1* levou à perda de função de *Mi-1.2*, mas a troca recíproca provocou um fenótipo letal, consistente com a ativação da resposta de defesa (HWANG et al., 2000).

O domínio NBS ocorre em várias proteínas com atividade de ligação a nucleotídeos e é essencial para o seu funcionamento. Um papel hipotético para os domínios NBS seria na alteração das interações entre os produtos dos genes *R* e outros membros da via de transdução de sinal.

Recentemente, o domínio NBS foi renomeado para NBS-ARC devido à sua similaridade nas proteínas Apaf-1 humana, proteínas **R** de vegetais e a proteína CED-4 de nematóide. A família de proteínas Apaf-1/CED-4 funciona como reguladores críticos de apoptose e de vias de sinalização (LI et al., 1997). Os genes *R* que apresentam os domínios NBS-LRR, cerca de 15 genes dos já identificados, não apresentam um mecanismo óbvio de transdução de sinal devido à ausência de um domínio cinase. No entanto, devido à similaridade do domínio NBS nas proteínas *R*, Apaf-1 e CED-4, um modelo análogo à ativação de cascatas sinalizadoras envolvendo Apaf-1 e CED-4, foi proposto para os genes *R* que contém o domínio NBS. Durante o processo de apoptose, ocorre heterodimerização entre Apaf-1 e CED-4 e suas respectivas proteases, caspase-9 e CED-3, o que resulta na interação entre os domínios homólogos presentes na região N-terminal dessas proteínas. Similarmente, as proteínas NBS-LRR podem interagir com suas regiões TIR (“Toll/interleukin receptor”) ou LZ (zíper de leucina) para formar heterodímeros com outras proteínas que participam da cascata sinalizadora (BIEZEN & JONES, 1998).

Os genes *Prf*, *RPS2* e *RPM1*, que codificam proteínas que apresentam os motivos LRR e NBS, possuem também seqüências LZ que estão entre o N-terminal e os domínios NBS e LRR. Esse tipo de motivo está envolvido em interações proteína-proteína. Alguns fatores de transcrição de eucariotos possuem seqüências LZ que são importantes na homo e heterodimerização dos fatores de transcrição (BENT, 1996). Não se conseguiu ainda nenhum dado experimental que pudesse esclarecer a função de domínios LZ em proteínas *R* de plantas.

Recentes análises de um grande número de NBS-LRR têm considerado a presença da estrutura “coiled-coil” (CC) mais característica em lugar de LZ (PAN et al., 2000). CCs são feixes de duas a cinco hélices que possuem distintos empacotamentos de cadeias laterais aminoacídicas na interface hélice-hélice. A

estrutura CC tipicamente exhibe uma organização de sete resíduos repetidos com as cadeias laterais hidrofóbicas de dois dos aminoácidos formando uma interface de interações entre os *coils* (LUPAS, 1996).

Além do domínio LZ, outros genes, que também apresentam os domínios LRR e NBS, diferem na região N-terminal por apresentarem um domínio, denominado TIR, que apresenta alta homologia com o domínio citoplasmático do gene de desenvolvimento *Toll* de *Drosophila* e do gene da interleucina 1 (*IL-1*), que codifica uma proteína de resposta do sistema imune de mamíferos. Embora muitos estudos com diferentes genes *R* tenham sugerido que o domínio LRR é o principal responsável pelo reconhecimento nas interações proteína-proteína, recentes análises têm mostrado que o domínio TIR também pode estar envolvido no reconhecimento do patógeno. Nos 13 alelos do gene de resistência *L* de linho a variação no domínio TIR foi associada com mudanças no reconhecimento do patógeno (ELLIS et al., 2000). Dois desses alelos, *L6* e *L7*, com distintas especificidades para diferentes isolados do patógeno, apresentavam polimorfismo apenas no domínio TIR.

O gene *mlo* foi identificado em plantas de cevada por seleção de fenótipos mutantes resistentes. O fenótipo selvagem, condicionado pelo alelo *Mlo*, apresenta resistência atenuada enquanto que nos mutantes os mecanismos de resistência são desreprimidos. Este gene não contém nenhum dos domínios comuns aos genes *R* descritos anteriormente e confere ampla resistência a todos os isolados do fungo *Erysiphe graminis* f. sp. hordei. O produto gênico é ancorado à membrana por sete regiões espaçadoras em hélice indicando ser este um receptor associado à proteína G (BUSCHGES et al., 1997; PIFFANELLI et al., 1999).

2.3. Clonagem e Classificação dos Genes de Resistência

Em 1992, foi clonado o primeiro gene *R*, o gene *Hm1* de milho (JOHAL & BRIGGS, 1992). Atualmente, o número de genes *R* clonados já ultrapassa a 20. O

desenvolvimento das técnicas de “transposon tagging” e clonagem baseada em mapa possibilitaram o isolamento de todos os genes *R* até então clonados.

De acordo com suas características estruturais, os genes *R* podem ser agrupados em diferentes classes (BAKER et al., 1997; BENT, 1996; MARTIN, 1999; MELCHERS & STUIVER, 2000). A primeira classe é representada pelo gene *Hm1*, que codifica uma redutase dependente de NADPH (HTRC) que inativa a toxina HC produzida pelo fungo *Cochliobolus carbonum*. A interação entre *C. carbonum* e milho diferem do modelo gene-a-gene, já que em cepas deficientes em toxina HC a capacidade de provocar doença foi perdida. Essa interação também foge do modelo elicitor-receptor que é o que mais se adequa ao modelo gene-a-gene, do ponto de vista molecular (JOHAL & BRIGGS, 1992; MEELEY et al., 1992).

O gene *Pto* de tomate foi o primeiro gene a ser clonado que segue o modelo gene-a-gene (MARTIN et al., 1993) e representa a segunda classe de genes *R*. A estratégia usada foi a clonagem baseada em mapa. Um marcador de RFLP (“restriction fragment length polymorphism”) fortemente ligado ao loco *Pto* foi usado em um “screening” de uma biblioteca genômica construída em YAC (cromossomo artificial de levedura). O clone de YAC identificado foi usado para isolar o cDNA correspondente ao gene *Pto*. A análise de seqüência do clone indicou que esse gene codificava uma proteína cinase do tipo serina/treonina.

Posteriormente, outros genes *R* foram isolados, que seguiam o modelo gene-a-gene, porém eles não possuem motivos estruturais semelhantes a *Pto*. Essa nova classe de genes codifica proteínas receptoras citoplasmáticas que contém domínios repetidos LRR e um sítio de ligação a nucleotídeos (NBS). Pertencem a essa classe os genes *I2* de tomate e *RGC2* de alface (ORI et al., 1997).

Outros membros desta classe apresentam além dos domínios LRR e NBS, um outro domínio na região N-terminal, sendo que este pode diferir entre eles. Alguns membros possuem na região N-terminal o domínio TIR; como exemplos temos *RPP5* e *RPP1* de *Arabidopsis thaliana*, *N* de tabaco (WITHAM et al., 1994) e *L⁶* de linho (LAWRENCE et al., 1995). Outros membros possuem um motivo

"leucine zipper" (LZ) ou CC. Como exemplos temos *RPS2* de *Arabidopsis thaliana* (BENT et al., 1994; MINDRINOS et al., 1994), *Prf* de tomate (SALMERON et al., 1996), *RPM1* de *A. thaliana* (GRANT et al., 1995), *Rx* de batata (BENDAHDANE et al., 1999) e *Mla* de cevada (ZHOU et al., 2001).

A quarta classe é representada por genes que codificam proteínas que estão ancoradas na membrana, possuindo domínios LRRs extracitoplasmáticos e transmembrana (TM). Fazem parte desta classe os genes *Cf9* (JONES et al., 1994) e *Cf2* de tomate (DIXON et al., 1996).

Na quinta classe são agrupados os genes que codificam uma proteína transmembrana com domínios LRRs extracitoplasmáticos e um domínio celular que possui atividade cinase serina/treonina. Estes dois domínios são importantes para a proteína exercer a função de resistência. O gene *Xa21* de arroz (SONG et al., 1995), que confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* é o único gene desta classe clonado até o momento. *Xa21* possui o domínio que seria responsável pelo reconhecimento do patógeno, o domínio LRR, e a porção com a atividade de cinase, que ativaria a via de transdução de sinal.

A sexta classe é representada pelo gene *Xa21D*, membro da classe *Xa21*, e também confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Esse gene codifica uma proteína que não possui os domínios de cinase e transmembrana, possuindo apenas o domínio LRR, mas que, mesmo assim, exerce sua função. A perda desses domínios originou-se da integração de um retrotransposon Retrofit, que introduziu um códon de parada entre o domínio LRR e os domínios transmembrana e cinase, criando, assim, uma nova proteína, com uma provável localização celular diferente, que pode representar uma possível nova classe de genes de resistência (WANG et al., 1998).

A última, e mais recente classe é representada pelo gene *RPW8* de *Arabidopsis thaliana*. Esse gene codifica uma proteína relativamente pequena que carrega um potencial sinal de ancoramento à membrana e um domínio "coiled-coil". Embora não apresente semelhança com os outros genes *R* clonados, *RPW8* provê resistência associada à resposta de hipersensibilidade, que é comprometida em plantas transformadas com o gene bacteriano *nahG* (salicilato hidroxilase) e

em presença do alelo mutante *eds1*, gene que é requerido para sinalização apenas pelos genes *R* da classe TIR-NBS-LRR (XIAO et al., 2001). A superexpressão do gene *RPW8* leva à inibição do crescimento da planta e outros fenótipos consistentes com a ativação constitutiva das rotas de defesa.

O gene *mlo* de cevada, que confere resistência a todos os isolados do fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* e codifica um receptor acoplado à proteína G, parece representar uma classe distinta de genes *R* (BUSCHGES et al., 1997; PIFFANELLI et al., 1999). O Quadro 1 sumariza as diferentes classes dos genes *R*.

2.4. Caracterização de Genes Requeridos na Resposta de Defesa em Plantas

Os produtos de expressão dos genes de resistência (*R*) são os primeiros a interagirem direta ou indiretamente com moléculas elicitoras, as proteínas de avirulência dos patógenos (*Avr*), desencadeando a ativação de cascatas de transdução de sinal que levam à resistência. A maioria desses genes tem localização na membrana plasmática e determina a especificidade das interações entre plantas e patógenos.

Além dos genes *R*, vários genes são requeridos para a resistência a doenças (“RDR genes”) em plantas, entre estes incluem proteínas cinases (MAP cinases, cinases dependente de Ca^{+2}), proteínas com atividade antimicrobiana, proteínas com funções constitutivas ou regulatórias (supressores e indutores), proteínas envolvidas na geração de ROS e na biossíntese de moléculas com funções sinalizadoras. Esses genes são essenciais na defesa contra ampla gama de patógenos, provavelmente por atuarem em pontos basais das rotas de transdução de sinal (BUCHANAM et al., 2000).

Devido a uma restrita variedade de domínios e a conservação de similaridades estruturais presentes nos diferentes genes *R* clonados, espera-se

Quadro 1 – Classes de genes *R* isolados de plantas

Classe	Gene R	Planta	Patógeno	Estrutura*	Referências
1	<i>Hm1</i>	Milho	<i>Cochliobolus. carbonum</i> raça 1	Toxina	JOHAL & BRIGGS, 1992.
2	<i>Pto</i>	Tomate	<i>Pseudomonas. syringae</i> pv. tomato	Cinase	MARTIN et al., 1993.
	<i>PBS1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas. syringae</i>	Cinase	SWIDERSKI & INNES, 2001
3	<i>I2</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , raça 2	NBS-LRR	ORI et al., 1997.
	<i>RGC2</i>	Alface	<i>Bremia lactucae</i>	NBS-LRR	MEYERS et al., 1998.
	<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i> pv. Tomato	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	BENT et al., 1994.
	<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. syringae</i> pv. maculicola	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	GRANT et al., 1995.
	<i>RPP8</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	McDOWELL et al., 1998.
	<i>Prf</i>	Tomate	<i>P. syringae</i> pv. Tomato	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	SALMERON, et al., 1996.
	<i>Mi-1</i>	Tomate	<i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	VOS, et al., 1998.
	<i>Mla</i>	Cevada	<i>Blumeria graminis</i>	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	ZHOU et al., 2001.
	<i>Rx</i>	Batata	PVX	LZ-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR	BENDAHMANE et al., 1999.
	<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Phytophthora. parasitica</i>	TIR-NBS-LRR	.PARKER et al, 1997.

	<i>RPP1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>P. parasítica</i>	TIR-NBS-LRR	BOTELLA et al., 1998.
	<i>N</i>	Tabaco	TMV	TIR-NBS-LRR	WITHAM et al., 1994.
	<i>L⁶</i>	Linho	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR	LAWRENCE et al., 1995.
	<i>M</i>	Linho	<i>M. lini</i>	TIR-NBS-LRR	ANDERSON et al., 1997.
	locus <i>L</i>	Linho	<i>M. lini</i>	TIR-NBS-LRR	ELLIS et al., 1999.
4	<i>Cf-9</i>	Tomate	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM	JONES et al., 1994.
	<i>Cf-2</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	LRR-TM	DIXON et al., 1996.
	<i>Cf-4</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	LRR-TM	THOMAS et al., 1997.
	<i>Cf-5</i>	Tomate	<i>C. fulvum</i>	LRR-TM	DIXON et al., 1998.
	<i>Hs1^{pro-1}</i>	Beterraba	<i>Heterodera schachtii</i>	LRR-TM	CAI et al., 1997.
5	<i>Xa21</i>	Arroz	<i>Xantomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	LRR-TM-Cinase	SONG et al., 1995.
6	<i>Xa21D</i>	Arroz	<i>Xantomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	LRR	WANG, et al., 1998.
7	<i>RPW8</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	SAM:CC	XIAO et al., 2001.
8	<i>mlo</i>	Cevada	<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	Receptor acoplado à Proteína G	FREIALDENHOVEN et al., 1996.

*Repetições ricas em leucina (LRR), zíper de leucina (LZ), sítio de ligação a nucleotídios (NBS), região com homologia a *Toll*-IL 1R (TIR) e domínio transmembrana (TM), “coil-coiled” (CC) e sinal ancoradouro de membrana (SAM).

que existam limitadas rotas de transdução de sinal que sejam ativadas após a interação entre o produto do gene *R* e o elicitor.

A ativação de uma determinada rota parece estar relacionada com a estrutura do gene *R* bem como com o modo de vida do patógeno, biotrófico ou necrotrófico. Análises fenotípicas de mutantes de *Arabidopsis* permitiu identificar dois genes, *EDS1* e *NDR1*, que parecem estar envolvidos em rotas distintas de transdução de sinal na resposta de resistência, conforme a estrutura do gene *R* receptor (CENTURY et al., 1997). Como demonstrado por AARTS (1998), a inativação de *EDS1* bloqueia a resposta de resistência mediada por genes *R* da classe TIR-NBS-LRR, enquanto que inativação de *NDR1* bloqueia a resposta de resistência mediada por genes *R* da classe LZ-NS-LRR. Utilizando a mesma estratégia, pelos menos duas rotas distintas para o desenvolvimento de resistência sistêmica foram identificadas de acordo com o estilo de vida do patógeno. Com o uso de mutantes de *Arabidopsis* que eram comprometidos em sua capacidade de responder a ácido jasmônico ou de produzir ácido salicílico, foi possível identificar a existência de uma rota dependente de etileno e ácido jasmônico, que é ativada por patógenos necrotróficos e outra dependente de ácido salicílico, ativada por biotróficos (DIETRICH et al., 1997).

“Screening” de plantas mutantes incapazes de exibir uma determinada resposta de defesa ou resistência específica a um determinado patógeno, também tem sido uma estratégia importante para identificar diferentes genes com função regulatória e sinalizadores nas cascatas de sinalização. Vários mutantes de *Arabidopsis* foram identificados, como, por exemplo, o mutante *acd2*, que exibe uma HR acelerada (GREENBERG et al., 1994), o mutante *cpr*, que expressa constitutivamente proteínas relacionadas com a patogênese (CLARKE, 1998) e, ainda, o mutante *sai1*, que é insensível ao ácido salicílico (SHAH et al., 1999).

Genes envolvidos em respostas específicas também foram identificados, como o gene *RCR3* de tomate, que é expresso de maneira específica nas interações entre tomate e o fungo *Cladosporium fulvum*. Quando mutado *RCR3* compromete a função de *Cf-2*, mas não de *Cf5*, embora estes dois genes apresentem 93% de similaridade (DIXON, 2000).

Linhagens de cevada contendo o gene *Mla-12*, raça específico, e o gene *mlo*, raça inespecífico, foram mutados, o que permitiu a identificação de pelo menos três mecanismos independentes de sinalização durante a resposta de resistência para estes genes *R* de cevada à infecção por míldio. Dois mutantes que tiveram a resistência conferida pelo gene *Mla-12* abolida foram identificados e denominados mutantes *Rar* (“required for *Mla* resistance”). Nestes mutantes a resistência mediada por *mlo* e *Mlg*, um segundo gene *R* raça específico, não foi alterada. De maneira similar, dois locos requeridos para a resistência mediada por *mlo*, não interferiram na resistência mediada por *Mla-12* e *Mlg* (mutantes *Ror*).

À medida que novos genes vão sendo identificados, as rotas sinalizadoras que levam ao fenótipo de resistência vão sendo mais bem compreendidas e manipuladas em programas de melhoramento de plantas.

2.5. Métodos de Clonagem

Os principais métodos usados para clonar os genes *R* têm sido “transposon tagging” e clonagem baseada em mapa.

A estratégia de “transposon tagging” permite a identificação de fenótipos susceptíveis devido à inativação dos genes *R* na planta hospedeira pela inserção de um elemento genético móvel. Os genes *Cf-9* de tomate, que confere resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*, e *N* de tabaco que confere resistência ao vírus do mosaico do tabaco, foram clonados utilizando esta estratégia combinada com uma estratégia de seleção (JONES et al., 1994; WITHAM et al., 1994).

A clonagem baseada em mapa é feita com o auxílio de marcadores que segregam com o fenótipo de resistência. O gene *Pto* de tomate foi clonado utilizando um mapa de alta resolução da região que continha o gene e marcadores RFLPs intimamente ligados a esta região, o que permitiu identificar um YAC contendo o loco. O gene *RPS2*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. tomato e a *P. syringae* pv. maculicola em *Arabidopsis*, também foi clonado por uma técnica semelhante.

Com a clonagem de genes de resistência surgiram novas oportunidades e perspectivas para a clonagem de outros genes *R* usando metodologias recém desenvolvidas. Vale ressaltar que a confirmação de um candidato a gene *R* requer complementação funcional de um genótipo susceptível por transformação, ou ainda, pela produção de mutantes deficientes na resposta de resistência devido à inativação do gene *R*.

Tem sido proposto que as similaridades estruturais entre os genes de resistência podem ser usadas para identificar outros genes de resistência que tenham seqüências comuns (STASKAWICZ et al., 1995). Esses domínios recorrentes podem ser usados para desenhar “primers”, os quais, por PCR, podem amplificar regiões correspondentes em novos genes *R* (MICHELMORE, 1995; KANAZIN et al., 1996; BENT, 1996, STASKAWICZ et al., 1995).

KANAZIN et al. (1996) demonstraram que essa conservação de nucleotídeos encontrada nos genes de resistência pode ser usada para isolar seqüências que tenham motivos similares aos genes de resistência e com isso possibilitar clonagem desses genes em outras espécies. Usando “primers” degenerados para as seqüências conservadas das regiões codificadoras dos genes de resistência *RPS2*, *N* e *L*⁶ o seu grupo obteve em soja, fragmentos que estavam correlacionados com os genes de resistência. O seqüenciamento desses produtos de amplificação indicou que em soja há pelo menos nove classes de análogos de genes de resistência. O “screening” de uma biblioteca de soja construída em BAC (“bacterial artificial chromosome”) usando esses fragmentos, como sondas, identificou seqüências únicas que foram agrupadas em sete classes. Vários grupos têm adotado essa estratégia para clonar e mapear possíveis candidatos a genes de resistência (LEISTER et al., 1997; MAREK et al., 1997a; MAREK et al., 1997b; KANAZIN & BLAKE, 1997; LAGUIDAH et al., 1997a; LAGUIDAH et al., 1997b; RIVKIN et al., 1997; SHEAN et al., 1997).

Um outro método que apresenta grande potencial no isolamento de genes de resistência, defesa e da via de transdução de sinal, é o “screening” de bibliotecas genômicas e de cDNA com sondas de DNA homólogas a genes de resistência. MARTINS (2000) isolou uma seqüência homóloga a genes de

resistência, a partir de um “screening” realizado em uma biblioteca genômica da variedade de soja FT-Cristalina, utilizando um fragmento de RFLP, homólogo a genes de resistência, como sonda. A comparação da sequência de aminoácidos predita, em todas as possíveis ORFs, com outras existentes no *GenBank*, revelou homologia da seqüência isolada com as proteínas “*Cf-2.1like*” de *Arabidopsis thaliana*, proteína de resistência a doenças homóloga a *Cf-2/Cf-5* de *Hordeum vulgare* e outras proteínas de resistência de *Lycopersicon*.

O “screening” para perda de uma resposta específica de resistência foi utilizado por GLAZEBROOK et al. (1997) para identificar mutantes de *Arabidopsis* que apresentavam redução na expressão da fitoalexina camalexina. Cinco mutantes deficientes em produzir camalexina (mutantes *pad*) foram identificados.

“Screening” para mutações que bloqueiam a indução de genes de defesa também são importantes para identificação de genes com função regulatória. A técnica baseia-se na fusão do promotor de interesse a um gene repórter, como, por exemplo, o gene da β -glucuronidase (GUS), seguida da exposição das plantas a um patógeno avirulento ou a estímulos de interesse. O gene *NPR1* foi caracterizado por meio desta estratégia (CAO et al., 1994). Mutações em *NPR1* bloquearam a indução de diferentes genes relacionados com a patogênese (PR) na presença de ácido salicílico, bem como a ativação das respostas de defesa sistêmicas.

Com a clonagem de vários genes *R* tem sido possível a utilização do sistema de duplo híbrido (CHIEN et al., 1991; FIELDS & STERNGLANZ, 1994) para identificar proteínas que interagem diretamente com as proteínas de resistência. TANG et al. (1996) tiveram sucesso em identificar proteínas que interagem com o produto gênico de *Pto* por meio desta estratégia. Mais recentemente, a mesma metodologia foi utilizada em *Arabidopsis* tendo como “isca” o gene *RPP5* da classe TIR-NBS-LRR. O domínio NBS interagiu com uma proteína similar à proteína bacteriana RelA/SpoT, que está envolvida na sinalização durante a síntese/degradação de fosfatos de guanosina (p)pppGpp (BIEZEN et al., 2000). Tais proteínas eram desconhecidas em eucariotos e seu

papel na resistência a doenças ainda não foi demonstrado.

2.6 – Estratégias de melhoramento genético baseadas no isolamento de genes *R*, nos mecanismos e genes envolvidos na resposta de resistência

A clonagem de vários genes de resistência e de defesa, juntamente com outros avanços da biologia molecular, tem aberto a oportunidade para os pesquisadores elaborarem estratégias para a criação de cultivares transgênicos resistentes por transformação direta de plantas susceptíveis. Atualmente várias estratégias podem ser enumeradas, sendo que algumas não são aplicáveis a todas as espécies de plantas:

- Superexpressão de genes *R*, como por exemplo, *Prf* (OLDROYD & STASKAWICZ, 1998) e *Pto* (TANG et al., 1999) em tomate, pela integração de várias cópias do gene sob o controle do seu próprio promotor ou de um promotor forte, como o do 35S do vírus CaMV. Esta estratégia levou a indução na expressão de genes relacionados à patogênese e aumento nos níveis de ácido salicílico, e não só intensificou a resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, mas promoveu um controle parcial de patógenos não relacionados, como *X. campestris* e *Cladosporium fulvum*.
- Expressão constitutiva de proteínas com ação fungicida (AFPs) em plantas transgênicas a fim de intensificar a resistência contra fungos. JONGEDIJK e colaboradores (1995) demonstraram que a co-expressão das enzimas hidrolíticas, quitinase e 1,3-glucanase de tabaco, em plantas de tomate, conferiram altos níveis de resistência ao fungo *Fusarium oxysporum*, do que expressão de cada gene independente. WU e colaboradores (1995) também demonstraram que a expressão constitutiva da enzima glucose oxidase, que gera H₂O₂, provê resistência a doenças para vários patógenos como *Erwinia carotovora*, *Phytophthora infestans* e *Verticillium* sp.
- Transferência de um gene de avirulência para uma planta contendo o gene *R* correspondente, sendo que o gene *Avr* estaria sob controle de um promotor

induzível local e rapidamente por vários tipos de patógenos. Esta estratégia foi testada em tomate com a transferência do gene *Avr9* (DE WIT, 1992).

- Engenharia de genes *R* que garantam resistência para uma ampla gama de patógenos. O desenho de tais genes seria baseado no reconhecimento de fatores do patógeno importantes para sua virulência e patogenicidade, de modo que estariam sob baixa pressão seletiva.
- “Screening” para identificação de genes *R* que apresentem resistência durável e que reconheçam proteínas *Avr* para ampla gama de patógenos. As proteínas *Avr* utilizadas no “screening” também devem participar na virulência e terem secreção órgão-inespecífica. Tal estratégia foi utilizada para a identificação do gene *cf-ECP2*. A proteína ECP2 é secretada pelo fungo *Cladosporium fulvum*, em isolados de todo o mundo, e é essencial para a patogenicidade. Plantas transgênicas expresando *ECP2*, que responderam com HR, foram identificadas e analisadas geneticamente, o que demonstrou que estas carregam um único gene dominante que induz HR dependente de *ECP2*, que foi nomeado *cf-ECP2* (LAUGE et al., 1998).
- Superexpressão de *NPR1*: este gene codifica um importante fator transcricional que atua nas respostas sistêmicas adquirida e induzida. A superexpressão deste gene intensifica a resposta de defesa para uma ampla variedade de patógenos em *Arabidopsis* sp. e arroz, no entanto em trigo houve aumento da susceptibilidade (CAO et al., 1998). Um fato notável é que a superexpressão de *NPR1* não está associada com nenhum fenótipo adverso na planta, como morte celular e atrofia.
- Superexpressão de *Pad4*: este gene parece atuar na amplificação de um sinal fraco na resposta de resistência por meio de um ciclo de “feedback” positivo, que envolve ácido salicílico. A inativação deste gene levou a uma extrema susceptibilidade a uma grande variedade de patógenos, incluindo *Erwinia orontii*, *Peronospora parasitica* e *Pseudomonas syringae* (JIRAGE et al., 1999; REUBER et al., 1997; GLAZEBROOK et al., 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Genético

Para a construção do banco de cDNA e análise da expressão órgão-específica dos clones isolados foi utilizada a variedade de soja FT-Cristalina, resistente ao cretamento foliar (*Cercospora kikuchii*) e à mancha “olho-de-rã” (*C. sojina*) (YORINORI, 1991), obtida junto ao Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. O material vegetal (folha, caule e raiz) foi colhido no estágio V3 de desenvolvimento, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até sua utilização. As sementes foram colhidas aos 25 dias após o florescimento (DAF).

3.2 Extração de RNA Total

Todas as etapas para isolamento do RNA, para a construção do banco de cDNA, bem como para análise de expressão gênica, foram conduzidas a 4°C. A água e as soluções utilizadas foram tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%, a 37°C por 8 h, e, em seguida, autoclavadas.

Cerca de 2 g de folhas, caule, raiz ou semente da variedade de soja FT-Cristalina foram triturados em nitrogênio líquido. À cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES [0,1 mol/L de NaCl; 0,01 mol/L de Tris-HCl pH 7,5; 1,0 mmol/L de EDTA (ácido etilenodiaminatetracético) e 1% de SDS (docecil sulfato de sódio)] e 12 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) (WADSWORTH et al., 1988). A amostra foi vigorosamente agitada em vórtex, por 15 min. Às fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação a 16.000 g, por 10 min. À fase aquosa foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 2 mmoles/L e 2 volumes de etanol 96% (v/v) e, em seguida, a mistura foi incubada por 1 hora a -20°C. O precipitado foi coletado por centrifugação a 16.000 g por 15 min, lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspenso em água. O mesmo volume de LiCl 4 moles/L foi adicionado para permitir a precipitação específica do RNA total, e este foi incubado durante a noite no gelo, a 4°C. O RNA foi coletado por centrifugação por 30 min a 8.000 g, o precipitado foi ressuspenso em 1,8 mL de água e reprecipitado pela adição 0,2 mL de acetato de sódio 2 moles/L e 2 volumes de etanol 96% (v/v) gelado seguido de incubação durante a noite a -20°C. O RNA foi novamente coletado por centrifugação por 10 min a 8.000 g e o precipitado lavado em etanol 70% e, então, ressuspenso em água tratada com DEPC.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80°C até o seu uso. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em géis de agarose desnaturante (contendo 0,6 moles/L de formaldeído), a 1,8% (contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio). Como tampão de corrida foi utilizado o tampão MOPS (0,02 moles/L de MOPS, pH 7,0; 5 mmoles/L de acetato de sódio; 1 mmol/L de EDTA, pH 8,0).

3.3 Construção do Banco de cDNA

O banco de cDNA foi construído a partir do RNA mensageiro (mRNA) de folha de soja, variedade FT-Cristalina, estágio V3 de desenvolvimento, utilizando

o vetor de clonagem Uni-ZAP XR contido no kit comercial “cDNA Synthesis Kit”, “ZAP-cDNA Synthesis Kit” (STRATAGENE).

3.3.1 Extração de mRNA poliA⁺

O mRNA poliA⁺ foi isolado a partir do RNA total com o auxílio do Kit “PolyTtract mRNA Isolation Systems” (PROMEGA), a fim de ser utilizado na construção do banco de cDNA. O sistema utiliza “primers” oligo(dT) biotinilados que hibridizam com alta eficiência à cauda poliA⁺ presente no terminal 3' do mRNA. O híbrido é, então, capturado por partículas magnéticas contendo moléculas de estreptavidina ligadas à sua superfície.

Um volume da solução de RNA contendo cerca de 1 mg RNA total foi aquecido por 10 min a 65°C e então adicionou-se 3 µL da sonda oligo(dT) biotinilada e 13 µL de SSC 20X (citrato de sódio 0,3 mmoles/L; NaCl 3 moles/L). A mistura foi incubada por 10 min à temperatura ambiente a fim de permitir o anelamento entre a sonda e a cauda poliA⁺ presente na molécula de RNA mensageiro. Paralelamente, as partículas paramagnéticas, que apresentam estreptavidina ligadas, foram lavadas 3 vezes com SSC 0,5X e incubadas com a reação de anelamento por 10 min, à temperatura ambiente, a fim de permitir a interação entre as moléculas de estreptavidina ligadas às partículas paramagnéticas e o híbrido mRNA-oligo(dT) biotinilado. Com auxílio de uma barra magnética, as partículas paramagnéticas, e conseqüentemente o RNA mensageiro, foram capturados, enquanto o sobrenadante foi descartado. As partículas foram lavadas 4 vezes com SSC 0,1X e ressuspensas em 0,1 mL de água DEPC, que ocasiona o rompimento da interação entre as moléculas de biotina e estreptavidina, liberando o mRNA no sobrenadante.

O mRNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80°C até o seu uso. A integridade do RNA isolado foi avaliada por eletroforese em géis de agarose desnaturante (contendo 0,6 moles/L de formaldeído), a 1,8% (contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio).

3.3.2 Síntese do cDNA

A primeira fita do cDNA foi sintetizada com auxílio da transcriptase reversa MMLV-RT (“Maloney Murine leukemia vírus Reverse Transcriptase”) e um “primer” de 50 oligonucleotídeos, conforme o esquema na Figura 2, tendo como molde o mRNA poliA⁺. O iniciador apresenta, além de 18 desoxitimidinas, o sítio de restrição da enzima *Xho* I e uma seqüência denominada “GAGA”, para proteção do sítio de restrição da enzima.

5' GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGT**CTCGAG**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
Xho I

FIGURA 2 - Seqüência do “primer” utilizado na síntese da primeira fita do CDNA. Em negrito está representado o sítio de restrição da enzima *Xho* I, tendo à sua direita 18 bases T, e à sua esquerda a seqüência “GAGA” para proteção do sítio.

À cerca de 5 µg de mRNA poliA⁺ foram adicionados 40 U de inibidor de RNase (“Rnase Block Ribonuclease Inhibitor”, STRATAGENE) e 2,8 µg do “primer” oligo (dT), sendo o volume final da reação, 50 µL, ajustado pela adição de água tratada com DEPC. A reação foi incubada por 10 min à temperatura ambiente, a fim de permitir o anelamento do “primer”, e, em seguida, foi adicionado 1,5 µL (50 U/µL) da enzima transcriptase reversa MMLV-RT. A reação foi incubada por 1 h a 37°C. Após a incubação a reação foi transferida para o gelo.

Para síntese da segunda fita do cDNA, o híbrido cDNA:mRNA foi usado como molde para uma reação de “nick translation” pelo tratamento da reação da primeira fita com a enzima RNase H, que cliva a molécula de mRNA, produzindo quebras e falhas que são preenchidas pela DNA polimerase I.

À reação da primeira fita foram adicionados 20 µL do tampão para síntese da segunda fita, os quatro dNTPs 0,5 mmoles/L cada, 2 µL de RNase H (1,5 U/µL)

e 11 µL de DNA polimerase I (9 U/µL). O volume final de 200 µL foi ajustado pela adição de água DEPC. A reação foi incubada por 2 h e 30 min a 16°C e logo após, transferida para o gelo.

Para aumentar a chance de obtenção de moléculas de cDNAs completas a reação foi incubada por 30 min, a 72°C, com 2 µL da enzima *Pfu* DNA polimerase (2,5 U/µL) e dNTP's (0,5 mmoles/L), para o preenchimento do terminal 5' da molécula de cDNA. Finalmente os produtos da reação foram precipitados durante a noite, a -20°C, pela adição de 20 µL de acetato de sódio (NaOAc) 3 moles/L e 400 µL de etanol absoluto. Esta etapa foi seguida de centrifugação a 14.000 g por 1 h. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 min a 14.000 g.

Todos os componentes e recomendações para síntese da primeira e segunda fita do cDNA foram fornecidos no "kit" comercial "cDNA Synthesis" (STRATAGENE).

3.3.3 Ligação dos Adaptadores

Para a ligação das moléculas de cDNA ao vetor Uni-Zap XR, previamente digerido com *Eco* RI e *Xho* I, adaptadores de *Eco* RI foram ligados a estas moléculas. O adaptador apresenta duas fitas de nucleotídeos, com 10 e 14 resíduos, complementares entre si, com um sítio de *Eco* RI na extremidade 5' de uma fita composta por 14 nucleotídeos, gerando uma extremidade coesiva, conforme esquematizado na Figura 3. Apenas a extremidade 5' da fita de 10 nucleotídeos é fosforilada.

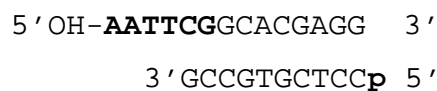


FIGURA 3- Adaptador de *Eco* RI utilizado para ligação nas moléculas de cDNA para a construção do banco de cDNA. O sítio de restrição de *Eco* RI está destacado em negrito.

Para ligação dos adaptadores, o precipitado oriundo da reação de síntese da segunda fita, foi ressuspenso em 9 μL da solução de adaptadores e incubado a 4°C por pelo menos 30 min para a ressuspensão do cDNA. Posteriormente, a 7 μL desta suspensão foram adicionados 1 μL do tampão da enzima DNA ligase 10X, 1 μL de ATP 10 mmoles/L e 1 μL da enzima T4 DNA ligase (4 U/ μL). A reação foi incubada a 8°C durante a noite. No dia seguinte, a reação foi mantida a 70°C por 30 min para inativação da enzima.

Após a ligação dos adaptadores no cDNA o terminal 5' do oligonucleotídeo de 14 nucleotídeos foi fosforilado a fim de permitir sua ligação ao vetor. Para tal, à reação foram adicionados 1 μL do tampão da enzima DNA ligase 10X, 2 μL de ATP 10 mmoles/L e 1 μL da enzima T4 polinucleotídeo cinase (10 U/ μL). O volume da reação foi ajustado para 20 μL pela adição de água DEPC. A reação foi incubada por 30 min a 37°C. Finalmente a enzima foi inativada a 70°C por 30 min.

Para permitir a liberação do adaptador de *Eco* RI e resíduos do “primer” oligo(dT) da extremidade 3' terminal do cDNA, este foi digerido com a enzima de restrição *Xho* I. Ao cDNA fosforilado foram adicionados 28 μL do tampão da enzima de restrição *Xho* I e 3 μL da enzima. A reação foi incubada por 1 h e 30 min a 37°C para digestão e, em seguida, foi precipitada pela adição de 5 μL de STE 10X (1 mol/L NaCl; 200 mmoles/L de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mmoles/L de EDTA) e 125 μL de etanol 100% e incubação por pelo menos 12 h a -20°C.

Ao final da síntese, o cDNA apresenta as duas extremidades coesivas, uma com um sítio para *Eco* RI (5') e outra com um sítio para *Xho* I (3'), o que permite determinar a orientação do fragmento de cDNA a ser clonado (*Eco* RI – *Xho* I) com relação ao promotor *LacZ* presente no vetor. Um esquema com todas as etapas envolvidas na síntese do cDNA pode ser observado na Figura 4. Após a síntese do cDNA este foi fracionado em coluna Sepharose CL-2B para purificação de moléculas de cDNA de tamanho satisfatório para clonagem (> 400pb) e descarte dos outros reagentes adicionados nas etapas de síntese. Às frações coletadas foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), seguido de

centrifugação a 14.000 *g*, por 2 min à temperatura ambiente, para coleta da fase aquosa. Igual volume de clorofórmio foi adicionado e novamente as frações foram centrifugadas por 2 min a 14.000 *g*. À fase aquosa foram adicionados 2 volumes de etanol 100% seguida de incubação por toda noite a -20°C. No dia seguinte, as frações foram centrifugadas por 1 h a 14.000 *g*. O precipitado foi lavado cuidadosamente com etanol 80% e seco à temperatura ambiente por 5 min. O precipitado foi então ressuspensão em 5 µl de água DEPC.

3.3.4 Ligação das moléculas de cDNA no vetor Uni-ZAP XR e Empacotamento

O vetor utilizado para construção do banco de cDNA foi o Uni-ZAP XR contido “cDNA Synthesis Kit”, “ZAP-cDNA Synthesis Kit” (STRATAGENE). Este vetor permite a clonagem de fragmentos de cDNA de 0 a 10 Kb e é duplamente digerido com *Eco* RI e *Xho* I que geram extremidades compatíveis com as das moléculas de cDNA sintetizadas à partir do mRNA poliA⁺. Uma característica conveniente deste vetor é a capacidade de excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript, o que permite que os fragmentos clonados possam ser caracterizados como num sistema plasmidial.

A reação de ligação consistiu de 2 µL do cDNA (aproximadamente 0,2 µg), 1 µL do vetor Uni-ZAP XR (1 µg/µL), 0,5 µL do tampão 10X da enzima DNA ligase, 0,5 µL de rATP 10 mmoles/L, e 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (4 U/µL). O volume final de 5 µL foi ajustado com água miliQ. A reação foi incubada por 12 h durante toda noite, a 4°C. No dia seguinte 1 µL da reação de ligação foi utilizada para empacotamento utilizando o extrato de empacotamento *in vitro* “GIGAPACK III Gold”, (STRATAGENE). A reação foi gentilmente misturada com uma micropipeta e rapidamente centrifugada. Após a incubação por 2 h, à temperatura ambiente, foram adicionados 500 µL de tampão SM (NaCl 0,1 mol/L; MgSO₄ 8,1 mmoles/L; Tris-HCl 50 mmoles/L pH 7,5; gelatina 2%) e

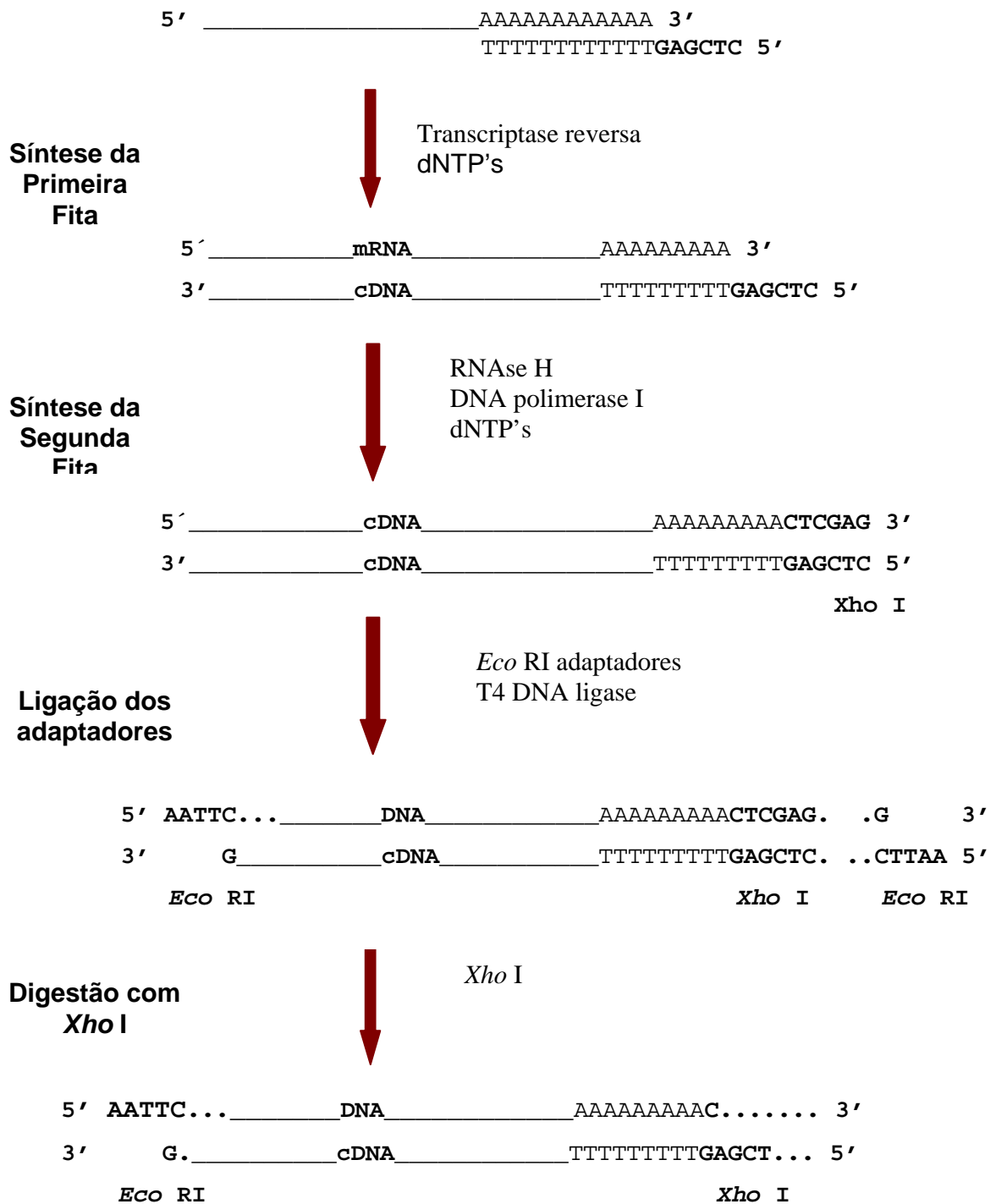


FIGURA 4 - Síntese das moléculas de cDNA a serem utilizadas na construção do banco de cDNA .

20 μL de clorofórmio. O material foi centrifugado rapidamente, sendo o sobrenadante recolhido e mantido a 4°C até a etapa de titulação.

3.3.5 Titulação e Amplificação da Biblioteca

Uma colônia isolada da linhagem bacteriana XL1-BLUE MRF' foi inoculada em meio LB (SIGMA) suplementado com MgSO_4 10 mmoles/L e maltose 0,2%. Esta cultura foi incubada a 37°C por 4 a 6 h, sob uma agitação de 180 rpm, até que atingissem $\text{OD}_{600} = 1,0$. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 500 g por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em MgSO_4 10 mmoles/L para uma $\text{OD}_{600} = 0,5$. Cerca de $2,5 \times 10^8$ células/mL. As células foram armazenadas a 4°C por no máximo dois dias para assegurar máxima eficiência de infecção.

Um μL de diferentes diluições da mistura de empacotamento foi utilizado para infectar 200 μL da suspensão da célula hospedeira *E. coli* XL1-BLUE MRF'. Estes foram incubados por 15 min a 37°C e então plaqueados juntamente com 3 mL de NZY top ágar em placas contendo meio NZY sólido, pH 7,5 (caseína hidrolisada 1%, NaCl 0,5%, MgSO_4 0,2% e bactoextrato de levedura 0,5%), onde previamente foram plaqueados 15 μL de IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo 0,5 mmoles/L) e 50 μL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo 250 mg/ml). As placas foram incubadas a 37°C durante 6 a 8 h e então a razão entre bactérias recombinantes e não recombinantes foi determinada com base na coloração das placas de lise. As placas de lise contendo bactérias recombinantes são incapazes de sintetizar a galactosidade, uma vez que vetor apresenta o inserto interrompendo o gene que codifica para esta proteína, apresentando então coloração clara em meio contendo IPTG e X-gal. Idealmente, o número de placas azuis deve ser inferior a 1×10^5 pfu/ μg de cDNA empacotado, enquanto o de placas claras deve ser 10 a 100 vezes superior ao número de placas azuis.

Para o cálculo do título do banco de cDNA foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Pfu/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de placas de lise} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Alíquota plaqueada (mL)}}$$

Cerca de 9×10^4 unidades formadoras de placa (pfu) por μg de cDNA empacotado foram obtidas, o que equivale a um título de $4,8 \times 10^4$ pfu/mL, prévio à amplificação.

O tamanho mínimo necessário de um banco de cDNA, ou seja, suficiente para incluir um clone de interesse, é reflexo direto da abundância do mRNA específico (n° de cópias/célula). Como no presente trabalho objetivou-se clonar seqüências homólogas a genes envolvidos na resposta de resistência a patógenos, e espera-se que muitos dos genes envolvidos desde a síntese de barreiras pré-formadas, no reconhecimento do patógeno e até mesmo na transdução de sinal, apresentem um padrão de expressão constitutivo, nenhuma metodologia de enriquecimento do banco de cDNA ou indução de expressão gênica foi empregada.

Para estimar o número de clones requeridos para garantir a representatividade de uma determinada molécula de mRNA no banco foi utilizada a fórmula:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - 1/n)}$$

onde N representa o número de clones requeridos, P é a probabilidade desejada de encontrar determinado clone (normalmente 0,99) e n reflete a abundância de uma específica molécula de mRNA em relação ao total de moléculas de mRNA expressas pela célula.

Para amplificação, as células hospedeiras XL1-BLUE MRF' foram preparadas com descrito anteriormente e 600 μL destas células, a $\text{OD}_{600} = 0,5$, foram infectadas por $2,5 \times 10^4$ fagos recombinantes. A mistura foi incubada por 15 min a 37°C e então plaqueada, juntamente com 6,5 mL de NZY top-ágar fundido,

em placas de 150 mm contendo o mesmo meio sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 6 a 8 h para permitir a lise e, conseqüentemente, amplificação dos fagos. Após esta incubação adicionou-se 10 mL de SM e novamente incubou-se a 4°C durante toda noite, a fim de permitir a difusão dos fagos para o tampão. O tampão foi recolhido e adicionou-se clorofórmio a uma concentração final de 5% (v/v). A suspensão foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 15 min e em seguida, foi feita uma centrifugação por 10 min a 500 g e ao sobrenadante foi adicionado clorofórmio a uma concentração final de 0,3% (v/v). O material foi armazenado a 4°C até o momento da sua utilização.

Uma nova titulação da biblioteca foi realizada para determinar o título após a amplificação. A etapa de amplificação permite aumentar o número de cópias de cada fago recombinante obtido na reação de ligação. Um µL de diluições seriadas do banco amplificado foi inoculado em 200 µL da célula hospedeira. A mistura foi incubada por 15 min a 37°C e, em seguida, plaqueada juntamente com 3,0 mL de NZY top-ágar fundido, em placas contendo o mesmo meio sólido. As placas foram incubadas a 37°C, por 6 a 8 h, e então se deu a contagem das placas de lise.

O título final obtido após a amplificação foi de 4×10^9 pfu/mL.

3.4. “Screening” da biblioteca de cDNA usando a técnica de PCR

Durante a construção de um mapa de RFLP (“Random Fragment Length Polymorphism”) de soja (*Glycine soja* x *Glycine max*), foram analisadas várias sondas provenientes da clivagem de uma biblioteca genômica da variedade cultivada de soja Bônus (RAFALSKI & TINGEY, 1993). Quando os progenitores usados no mapa (*Glycine soja* x *G. max*) e a população segregante foram analisadas com estas sondas, observou-se que 75% das bandas eram monomórficas. Dentre as sondas que revelavam polimorfismo, algumas revelaram um grande número de bandas de DNA que eram altamente polimórficas entre diferentes cultivares, mapeando regiões hipervariáveis do genoma. A fim de melhor caracterizar este padrão hipervariável, as sondas foram seqüenciadas

(BARROS & RAFALSKI, 1998). Regiões presentes em três destas sondas (A45-10, A53-09 e A75-10) mostraram alta homologia com genes de resistência (*R*) a doenças presentes em várias espécies vegetais. Todas as três sondas também hibridizaram com seis diferentes genótipos de soja (Bônus, PI 81762, PI 416937, N85-2176, PI 153293 e PI 230970), apresentando mais uma vez um padrão polimórfico (MARTINS, 2000). Um fragmento de 295 pb, produto de amplificação de uma destas sondas, A53-09, com “primers” específicos, foi utilizado no presente trabalho na busca de seqüências transcritas, em soja FT-Cristalina, homólogas a genes envolvidos na resposta de defesa a fitopatógenos. Este fragmento utilizado como sonda, foi denominado A5309-295 e a sua seqüência pode ser observada na Figura 5.

Para determinar se moléculas de mRNA homólogas à sonda A5309-295 estariam representadas na biblioteca de cDNA, um “screening”, baseado na amplificação específica de insertos de fagos recombinantes como descrito por FRIEDMAN et. al (1990) foi realizado. Foram utilizados “primers” específicos que pareiam na sonda, A53-09A e A53-09D (Tabela 1) (BARROS & RAFALSKI, 1998), que originam um produto esperado de 295 pb.

As reações foram conduzidas no termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS) modelo 9600, com período inicial de desnaturação de 5 min, seguidos de 25 ciclos (94°C, por 80 s; 37°C, por 2 min; e 72°C, por 3 min) e período adicional de polimerização de 72°C por 7 min. Uma reação padrão de amplificação continha 2,5 mmol/L de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, 33 pmoles do “primer” A53-09 A, 33 pmoles do “primer” A53-09 D, 1 µL da biblioteca previamente aquecida a 70°C, por 5 min e esfriada a 0°C, 50 mmol/L de KCl, 10 mmoles/L de Tris-HCl pH 8,3, e 1,5 mmoles/L de MgCl₂, em um volume final de 100 µL.

Os produtos das reações foram separados em géis de agarose 1% imerso em tampão TBE (0,089 mmoles/L Tris-HCl; 0,089 mmoles/L de ácido bórico; 0,002 mmoles/L), contendo brometo de etídio 0,1 mg/mL, e visualizados por meio de luz ultravioleta.

XTTGAAGTTTGAAGTTTTXXTAGTTGATGAGTTAATXXXATGAAXXAXTTAAGXTAAAGTTXXAAG.....70
TATXTAAGAXTXTXXAATGAGXXTAGAAIXTTTTATTGTAAGTAAGAAAXAAAAATAATTTGAAXTXAAGT.....14
0
XXAAAAGATTXAAAATTTTTAGTTXAAAGXAAAAGAAAGAXTAATXTXTXXAXTXAAAXXXXTATAAGTTAGA....
210
GXXXGXAAGTTTGTXXAAGATTGATTTXXATGAXTTTAXXTGTTTTTTTGAAGTTAAAXXXXTTTXXATTTA.....280
XAGXAAATXXGATTTTGAAGAXXAXGATGAAAGXXTTTTTGAAGTTTXXTAGTXXAATXTTTAAGXTTA.....35
0
TTAGTTXATXXTTTXXTTXGXTTXAAGTXATATTGAGXXTTTXXTTTXXTTTXXATGAAAGTTGAG.....420
AGTTTGTGXAAGTTGAXAATATXAAAGAGAAGAAAXATGAGTTTXXATATAAGXAXTTXXATGAAAGAAAGAA.....49
0
AAAGAAAAAGTTTGAATXXAXAATTTTTXTTGTXXAXTTTTTTGATTTTAXTAXTAAXAATTTXTATATAAGT.....56
0
ATATATAXXATAAGAAGTTTGTGATTTAAAAATTTTATXXAXTAATTTTGTGTTTXXAAAAATGAXAXA.....63
0
TATTTAGAGTTATATATTTXTAXAAGGAGAXATXAGTTAAAAAGTTTXXAAXXAXATTTTGAAGXAXA.....70
0
AGXTTGAAGAXGTTAAXXAXXTAGTTTXXGAGTTXAGTAAAXXTXXATAGAAAGAAAGTAAAGAGAGAGAXT.....77
0
AAAGTGAAGAXTTTGTTTATATTTTXXTATATXAAAAAGXTTAAATXXATXTAXATATATAAGXTTTTATG.....840
XAGTTAAXAAGTXXXAXAAGXAAAAAGAAAAATAAAAATTTAATATXXTAAXAAXXATATTTXXTTTAT...
..910
TXXAXTAXXTAXATATXTTXXTAGAAAGXAXGATGATATXTTXXTTXAXGATTATAXXAGXTTXXATTTTXX.....9
80
TXATTTTGTGTTTXXTTXXTTXAAAXXXXTTTAXTXXXTTXAGT 1019

Figura 5 - Seqüência de nucleotídeos do clone de RFLP A53-09 (BARROS & RAFALSKI., 1998). Os trechos sublinhados correspondem a seqüências de leitura aberta (ORF), que são similares a genes de resistência a doenças. As seqüências marcadas em vermelho correspondem aos sítios de pareamento dos “primers” usados nas reações de PCR, para obtenção da sonda A5309-295, e no “screening” da biblioteca por PCR.

3.5. Extração de DNA dos bacteriófagos recombinantes

O isolamento de DNA de fagos recombinantes, contendo seqüências homólogas ao fragmento A5309-295, foi feito como descrito na literatura (SAMBROOK et al., 1989; AUSUBEL et al., 1998). O DNA isolado foi utilizado em um “Dot blotting” a fim de se determinar as condições de hibridização.

Inicialmente, as células hospedeiras *E. coli* XL1-Blue MRF' foram crescidas a 37°C em meio LB (SIGMA), acrescido de 0,2% de maltose e de MgSO₄ 10 mmoles/L, até atingirem OD₆₀₀= 1,0. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado diluído para OD₆₀₀= 0,5 em MgSO₄ a 10 mmoles/L. Os fagos recombinantes, aproximadamente 10.000 pfus (unidades formadoras de placa), representando uma alíquota da biblioteca, foram incubados com 200 µL de células hospedeiras a 37°C, por 15 min. As células foram diluídas em 50 mL de meio NZY e crescidas a 37°C, sob forte agitação, até que a lise das células fosse observada.

A fim de assegurar a lise completa, 100 µL de clorofórmio foram adicionados, prolongando-se a incubação por mais 10 min. Todas as etapas de extração foram realizadas conforme as instruções contidas no Kit "QIAGEN Lambda DNA Purification Kit" (QIAGEN INC.).

A precipitação das partículas dos fagos recombinantes foi feita com auxílio de PEG 8000 (polietilenoglicol) contido em um dos tampões. O DNA foi precipitado com isopropanol à temperatura ambiente, logo a seguir foi centrifugado a 15.000 g, por 30 min e a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 70%, seco a temperatura ambiente, ressuspenso em 200 µL de H₂O e armazenado a -20°C até sua utilização. A quantificação, assim como a análise da integridade do DNA, foram feitas em gel de agarose 0,8% utilizando-se padrões de concentrações conhecidas.

3.6. Marcação e Obtenção da Sonda

A sonda utilizada no presente trabalho, A5309-295, foi obtida pela amplificação do inserto do clone de RFLP A53-09, homólogo a genes de resistência a doenças em plantas, com os "primers" A53-09A (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') e A53-09D (5'-CTCCAATGAGCCTAGGAAGC-3'), originando um fragmento de aproximadamente 295 pb, que foi purificado usando-se o "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN INC.), conforme

recomendações do fabricante. O clone de RFLP A53-09 foi cedido pelo Dr. Rafalski (DuPont, EUA) e pertence a uma biblioteca genômica da variedade de soja Bônus, clonada no sítio *Pst* I do vetor pBluescript (STRATAGENE) (RAFALSKI e TINGEY, 1993). O fragmento utilizado como sonda foi marcada com flúor-12-dUTP usando-se o “Primer-It® Fluor Fluorescence Labeling Kit” (STRATAGENE), conforme recomendações do fabricante. A Figura 5 mostra a seqüência do clone de RFLP A53-09 na qual são indicados os sítios de anelamento dos “primers”.

3.7. “Dot Blotting”

Objetivando determinar a melhor condição de hibridização para isolamento de clones de cDNA homólogos à sonda A5309-295, diferentes temperaturas foram testadas.

Pontos foram demarcados nas membranas (Hybond-N⁺ AMERSHAM PHARMACIA) para aplicação de alíquotas de 5 ng de DNA, que foram utilizadas como controles nas hibridizações.

Inicialmente as membranas foram lavadas em SSC 6X e colocadas para secar. O DNA, previamente desnaturado por 5 min em água fervente e imediatamente transferido para o gelo, foi aplicado nas membranas com auxílio de uma pipeta. Para controle positivo foram utilizadas alíquotas de DNA de fago lambda extraído da biblioteca (quantidades de 5 ng, 10 ng e 20 ng), DNA correspondente à sonda a ser utilizada na busca dos clones homólogos a genes de resistência e DNA da variedade de soja FT-Cristalina. Como controle negativo foi aplicado 1 uL do vetor UniZap XR ($3,0 \times 10^8$ pfu/mL), utilizado na construção da biblioteca, e DNA bovino (quantidades 5 ng, 10 ng e 20 ng).

As membranas foram expostas à radiação UV de 120.000 microjoules/cm² por 30 s no “Stratalinker UV Crosslinker” (STRATAGENE) e armazenadas à temperatura ambiente até serem utilizadas em hibridização com a sonda A5309-295 (BARROS & RAFALSKI, 1998).

Quatro réplicas da mesma membrana foram preparadas e testadas em quatro diferentes temperaturas: 57°C, 60°C, 65°C e 68°C.

Para as hibridizações, foi utilizado o “Kit Illuminator Chemiluminescent Detection System” (STRATAGENE).

O fragmento de 295 pb, produto de amplificação com “primers” específicos do clone de RFLP A53-09 (BARROS & RAFALSKI, 1998), homólogo a genes de resistência a doenças em soja, foi utilizado como sonda. O fragmento foi previamente marcado com d-UTP fluoresceína com auxílio do Kit “Primer-It[®] Fluor Fluorescence Labeling Kit” (STRATAGENE).

As membranas foram inicialmente imersas em água e depois incubadas em uma solução em 10 mL de “QuikHSyb Hybridization Solution” (STRATAGENE) por 15 min a 57°C, 60°C, 65°C ou 68°C. Em seguida, foram adicionados 100 ng da sonda, previamente marcada, e 1 mg de DNA de esperma de salmão, seguido de um período de incubação a 57°C, 60°C, 65°C ou 68°C, por 2 h. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas em SSC a 0,1X e SDS a 0,1%, por uma vez a temperatura ambiente e duas vezes nas diferentes temperaturas testadas, por um período de 15 min. Todos os passos de detecção da sonda foram feitos à temperatura ambiente conforme recomendações do fabricante. A hibridização foi visualizada por autoradiografia.

3.8. “Screening” da Biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA de soja FT-Cristalina foi analisada conforme descrito por BENTON e DAVIS (1977). Antes da infecção com os fagos recombinantes a célula hospedeira *E. coli* XL1-Blue MRF' foi preparada. Inicialmente uma colônia bacteriana isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB, suplementado com 0,2% de maltose e MgSO₄ a 10 mmoles/L. Esta foi, então, incubada por 4 a 6 h a 37°C, sob uma agitação de 180 rpm, até que atingissem OD₆₀₀= 1,0. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado diluído para OD₆₀₀= 0,5 em MgSO₄ a 10 mmoles/L, cerca de 2,5 x

10^8 células/mL. As células foram armazenadas a 4°C por no máximo dois dias para assegurar máxima eficiência na infecção.

Alíquotas contendo 10^5 fagos recombinantes foram retiradas do estoque do banco e utilizadas para infectar 600µL de suspensão contendo a linhagem bacteriana *E. coli* XL1-MRF' previamente preparada. Após 15 min, a 37°C, foram adicionados 6 mL de NZY top ágar. A mistura foi vertida em placas de Petri (150 mm de diâmetro), contendo meio NZY sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h. Depois deste período as placas foram mantidas a 4°C. Membranas de náilon Hybond-N⁺ (AMERSHAM PHARMACIA), devidamente identificadas a lápis em três pontos não simétricos, para posterior identificação dos pontos positivos, foram colocadas em contato com a superfície do ágar para a transferência dos fagos recombinantes contidos nas placas de lise, e deixadas por 2 min à temperatura ambiente. Antes que as membranas fossem retiradas, as placas de Petri foram marcadas de acordo com pontos correspondentes na membrana, a fim de se permitir a posterior localização dos clones positivos. Posteriormente as membranas foram transferidas para a solução de desnaturação (NaCl 1,5 moles/L NaOH 0,5 moles/L) por 2 min e (NaCl 1,5 moles/L e Tris-HCl 0,5 moles/L, pH 8,0) por 5 min, e finalmente para a solução de neutralização, (0,2 moles/L Tris-HCl pH 7,5 / 2X SSC) por 30 seg, tendo sempre o lado contendo o DNA voltado para cima.

Logo após, as membranas foram colocadas sobre toalhas de papel, para secar, e então, o DNA das placas de lise foi imobilizado utilizando-se uma irradiação de 120.000 microjoules/cm² por 30 seg no "Stratalinker UV Crosslinker" (STRATAGENE). As membranas foram armazenadas à temperatura ambiente até serem utilizadas em hibridização com a sonda A5309-295 (BARROS & RAFALSKI, 1998).

Para as hibridizações foi utilizado o "Kit Illuminator Chemiluminescent Detection System" (STRATAGENE). As membranas foram inicialmente imersas em água e depois incubadas em uma solução em 10 mL de "QuickHyb Hybridization Solution" (STRATAGENE) por 15 min a 65°C. Em seguida, foram adicionados 100 ng da sonda A53-09 previamente marcada e 1 mg de DNA de

esperma de salmão e seguiu-se um período de incubação a 65°C por 2 h. Após o período de incubação, a membrana foi lavada em SSC a 0,1X e SDS a 0,1%, por uma vez a temperatura ambiente e duas vezes de 15 min, a 65°C. Todos os passos de detecção da sonda foram feitos à temperatura ambiente conforme recomendações do fabricante. O DNA hibridizado foi visualizado por autoradiografia. As placas de lise que corresponderam aos sinais observados no filme foram coletadas individualmente com pipetas Pasteur descartáveis, eluídas em 1 mL de tampão SM e armazenadas a 4°C após a adição de 20 µL de clorofórmio.

As unidades formadoras de placa resultantes do primeiro “screening” foram utilizadas em um segundo e terceiro “screening” a fim de isolar o clone desejado.

3.9. Excisão *in vivo* dos fagomídeos pBluescript do Vetor Uni-ZAP XR

Após o isolamento dos clones positivos foi realizada a excisão *in vivo* dos fagomídeos, que contém insertos homólogos à sonda A5309-295 (BARROS & RAFALSKI, 1998), do vetor Uni-ZAP XR, conforme instruções contidas no Kit comercial “cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit” (STRATAGENE). Esta estratégia elimina a etapa de subclonagem, uma vez que a excisão permite que o inserto seja caracterizado como em um sistema plasmidial.

Para a excisão, 200 µL da célula hospedeira XL1 BLUE MRF', previamente preparada como descrito anteriormente, foram co-infectadas com 1×10^5 fagos recombinantes, oriundos de uma placa de lise positiva, e 1×10^6 partículas do fago “helper ExAssist”. A mistura foi incubada por 15 min, a 37°C, e, após a adição de 3 mL de meio LB, as células foram novamente incubadas a 37°C, sob forte agitação, por 2 h e 30 min para permitir a excisão dos fagomídeos. Posteriormente as células foram incubadas a 70°C, por 20 min, e centrifugadas por 15 min a 1000 g. Cerca de 100 µL do sobrenadante, contendo os fagomídeos excisados, foram inoculados em 200 µL da célula hospedeira *E.*

coli SOLR e incubados por 15 min a 37°C. Estas células hospedeiras foram previamente crescidas a 37°C em meio LB, acrescido de 0,2% de maltose e de MgSO₄ 10 mmoles/L, até atingirem OD₆₀₀= 1,0. Em seguida, foram centrifugadas a 500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em MgSO₄ a 10 mmoles/L para uma OD₆₀₀= 0,5. O emprego da célula hospedeira *E. coli* SOLR durante a excisão garante que somente colônias contendo fagomídeos excisados sejam formadas, uma vez que é resistente à infecção do fago lambda e o fago “helper” não consegue replicar em seu interior.

Após a incubação, 200 µL da mistura foram plaqueados em meio LB sólido acrescido de 50 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas por 12 h, a 37°C, sendo, então, possível isolar colônias bacterianas contendo o fagomídeo excisado.

Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial dos clones isolados para que pudessem ser analisados por digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento.

3.10. Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi empregada para obtenção da sonda A5309-295, a ser utilizada nas hibridizações na busca de clones homólogos, e para isolamento de DNA dos fagomídeos excisados do vetor Uni-ZAP XR.

O isolamento do DNA plasmidial foi feito pelo método de purificação em colunas, de acordo com o "QIAprep Spin Miniprep Kit" (QIAGEN INC.).

Inicialmente as células hospedeiras *E. coli* XL1-Blue MRF' foram rompidas pelo método de lise alcalina e o volume das soluções ajustado de acordo com o volume inicial da cultura. Basicamente, a bactéria transformada foi crescida em meio LB a 37°C, contendo 100 µg/mL de ampicilina, por 12 a 16 h. Após centrifugação a 5.000 g, por 2 min, a 4°C as células foram ressuspensas na solução I (glicose 50 mmoles/L, Tris-HCl 25 mmoles/mL pH 8,0, EDTA 20 mmoles/L e RNase A na concentração final de 100 µg/mL). Em seguida, a solução

de lise (NaOH 0,2 moles/L e SDS 1%) foi adicionada e a mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. À essa mistura foi adicionado acetato de potássio, à concentração final de 1mol/L, prolongando-se a incubação por mais 15 min. O DNA foi separado dos resíduos insolúveis e do DNA cromossômico por meio de centrifugação a 11.000 *g*, por 10 min. O DNA plasmidial foi isolado do sobrenadante usando a resina pré-empacotada “QIAprep Spin” e “QIAGEN tipo 100” (QIAGEN INC.), conforme as recomendações do fabricante.

3.11. Seqüenciamento do DNA

O DNA foi seqüenciado usando-se o “ABI PRISM BigDye III Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (APPLIED BIOSYSTEMS). Este “kit” é adequado para o seqüenciamento de DNA usando o “ABI PRISM 377 Genetic Analyzer” (APPLIED BIOSYSTEMS). As reações de seqüenciamento baseiaram-se na técnica de seqüenciamento por terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977).

As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando o termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS), modelo 9.600, programado para um período inicial de desnaturação a 96°C, por 2 min, seguido por 30 ciclos (96°C, por 30 s; 50°C, por 20 s; e 60°C, por 4 min). As reações de seqüenciamento foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 8 µL de “mix” fornecido no “kit” de seqüenciamento, 10 pmoles de um “primer” e 200 a 500 ng do DNA a ser seqüenciado. Os produtos de extensão, produzidos na reação de seqüenciamento, foram purificados pela adição de 2 µL de NaOAc 3 mmoles e 50 µL de etanol 96% e incubação à temperatura ambiente por 15 min. Os fragmentos foram coletados por centrifugação a 16.000 *g* por 20 min. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70%, centrifugado por 5 min e seco à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 5 µL do tampão de corrida (1 volume de azul de bromofenol e 5 volumes de formamida), desnaturado a 95°C por 5 min e mantidos no gelo até a sua aplicação. Os produtos da extensão foram

separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 4,5% e a fluorescência emitida foi coletada por uma câmara CCD, sendo a informação processada pelo equipamento. Os dados foram automaticamente convertidos em seqüências de desoxinucleotídeos. Para obter a seqüência completa dos fragmentos clonados, “primers” foram desenhados com auxílio do Programa Primer3 Input Program” (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>). As seqüências dos “primers” podem ser observadas na Tabela 1.

As seqüências de nucleotídeo dos clones isolados foram analisadas pelo Programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.) e a busca por similaridades com outras seqüências depositadas no “GenBank” foi feita usando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). A predição de possíveis ORFs (seqüência de leitura aberta) foi realizada com o programa ORF Finder, ambos do “National Center for Biotechnology Information” – NCBI - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e por meio do Programa *SixFrame*. A predição dos possíveis domínios protéicos das ORFs foi feita usando o programa Pfam do Sanger Center (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>).

As seqüências nucleotídicas e os peptídeos preditos de cada clone foram alinhados entre si e com a sonda A5309-295, a fim de determinar regiões de identidade e homologia entre os clones e a sonda por meio do Programa *ClustalW*, disponível no endereço eletrônico <http://www.workbench.sdsc.edu> (Universidade de San Diego, CA, EUA).

3.12 Reações de Amplificação por PCR

As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador da (APPLIED BIOSYSTEMS), modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94°C, por 1 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min) e período adicional de polimerização a 72°C por 7 min. As reações foram realizadas em um volume final de 100 µL contendo 2,5 mmoles/L de cada dNTP, 1

U de *Taq* DNA polimerase, 0,4 pmoles de cada “primer”, 50 ng DNA molde, KCl 50 mmoles/L, Tris-HCl 10 mmoles/L pH 8,3 e MgCl₂ 1,5 mmoles/L.

Os produtos das reações foram separados por eletroforese em géis de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados por meio de luz ultravioleta.

3.13. RT-PCR

As amostras de RNA total de folha, raiz e haste da variedade FT-Cristalina, no estágio V3 do desenvolvimento, foram usadas nas reações de RT-PCR. As amostras de semente, da mesma variedade, foram isoladas aos 25 dias após a floração (DAF). Todas as amostras, antes de serem amplificadas, foram tratadas com “RQ1 RNase-free DNase” (PROMEGA) conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em tampão da “RQ1 RNase-free DNase” 1X (Tris-HCl 40 mmoles/L pH 8,0; MgSO₄ 10 mmoles/L e CaCl₂ 1 mmol/L) por 30 min a 37°C, extraídas com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), reextraídas com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e precipitadas pela adição de acetato de sódio e etanol. O RNA foi incubado a -20°C por no mínimo 12 h e depois coletado por centrifugação a 16.000 g por 30 min. O precipitado foi lavado em etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspensão em água DEPC.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o “SuperScript Kit Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis” (INVITROGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (2,5 µg) foram incubadas com 0,5 µg de oligo (dT)₁₂₋₁₈ a 70°C por 10 min e, em seguida, incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras, tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mmoles/L pH 8,4 e KCl 50 mmoles/L), MgCl₂ 5 mmoles/L, os quatro dNTPs 0,5 mmoles/L cada e DTT (ditiotretol) 5 mmoles/L, as quais foram incubadas a 42°C por 5 min. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima “SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase” (INVITROGEN) e as amostras foram incubadas por mais 50 min a 42°C. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi

degradado pela adição de 2 U de RNase H (INVITROGEN) a 37°C por 20 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes exceto a enzima transcriptase reversa.

As reações de síntese da segunda fita e amplificação foram conduzidas no termociclador da (APPLIED BIOSYSTEMS), modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94°C por 1 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 s; 55°C ou 50°C por 1 min; e 72°C por 2 min) e um período adicional de polimerização a 72°C, por 7 min. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 mmoles/L de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,4 pmoles de cada “primer”, 2,5 µL da reação de síntese da primeira fita, KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmoles/L pH 8,3 e MgCl₂ 1,5 mmoles/L. Nesta etapa foi feita uma reação controle usando os “primers” de actina 3 de soja (Tabela 1), com a finalidade de verificar a contaminação com DNA genômico e normalizar as concentrações de cDNA molde. Quando na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação, com os “primers” da actina 3, produzem um fragmento de 520 pb, já na presença de cDNA observa-se a presença de um fragmento de 440 pb devido à remoção de um íntron de 80 pb.

Os “primers” utilizados no RT-PCR foram os mesmos empregados nas reações de sequenciamento e suas seqüências estão contidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Pares de “primers” utilizados nas reações de RT-PCR e sequenciamento.

Clone	Nome	Posição	Seqüência (5'→3')
A5309-28	28F	243-263	AGCTGGCTGCAAAGAAAGAT
	28R	664-684	GCTTTTGGAAATCGAGTCTGG
A5309-41	41F	364-384	ACGTTATGGCTTGCTTGGAT
	41R	634-654	CCATATCTCATGGGCAACCT
A5309-48	48F	375-395	TTTGCATCTTAGGCCACCAT
	48R	712-732	CCAACGGAAAAGGGAAACTT
A5309-54	54F	302-322	TGTAAGTCTTTCAGAGGGGTCA
	54R	671-691	TTGGCGAGATGATGACAAAG
A53-09	A53-09 A	81-91	AATTAACCCTCACTAAAGGG
	A53-09 D	357-77	CTCCAATGAGCCTAGGAAGC
Cinase F	Faword	xxxx	CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG
Cinase R	Reverse	xxxx	GGAATCTCTCTGCCCCAATTGTG

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do DNA genômico da variedade de soja FT-Cristalina com “primers” específicos para o clone de RFLP A53-09, clonado a partir da variedade Bônus, homólogo a genes de resistência a doenças, gerou um produto de amplificação de 295 pb, confirmando a presença de seqüências homólogas a esse clone nesta variedade. Uma vez detectadas seqüências homólogas, foi construída uma biblioteca genômica (MARTINS, 2000), com a finalidade de melhor caracterizar regiões hipervariáveis em uma variedade de soja brasileira e isolar possíveis candidatos a genes de resistência. Três clones positivos foram isolados a partir dessa biblioteca, sendo que um deles, denominado GR, apresentou alta similaridade com genes de resistência a doenças. Análise de expressão por RT-PCR revelou que GR é expresso na raiz, caule e folha, indicando que o clone isolado deve ser um gene ativo (MARTINS, 2000).

Como o genoma de organismos eucariotos apresenta grande quantidade de DNA não relacionado a nenhum produto gênico, como regiões intergênicas e íntrons, objetivou-se, no presente trabalho, identificar e caracterizar seqüências expressas homólogas a genes envolvidos na resposta de resistência. Para tal o fragmento A5309-295, obtido pela amplificação do clone de RFLP A53-09 com os “primers” específicos A53-09A e A53-09D, foi utilizado como sonda na busca de clones positivos em uma biblioteca de cDNA de soja, da variedade FT-Cristalina. A

biblioteca de cDNA foi construída a partir de folha de soja, estágio V3, variedade FT-Cristalina e o seu título foi de 4×10^9 pfu/mL.

Para determinar moléculas de mRNA homólogas à sonda A5309-295 estavam representadas na biblioteca de cDNA, foi feito um “screening”, baseado na amplificação específica de insertos de fagos recombinantes (FRIEDMAN et al., 1990). Foram utilizados “primers” específicos que pareiam na sonda A5309-295 (BARROS & RAFALSKI, 1998) e que originam um produto de 295 pb. A mesma reação foi realizada a partir de DNA total extraído da biblioteca, bem como com o DNA total da soja FT-Cristalina e com o DNA da própria sonda como controles positivos. Em todas as reações foi obtido o produto esperado de 295 pb, indicando a presença de seqüências similares a A5309-295 no banco de cDNA. A amplificação com o DNA extraído da biblioteca detectou a presença de outras duas bandas adicionais, uma contendo cerca de 200 pb e outra com 400 pb (Figura 6).

Uma vez determinada a presença de seqüências similares a A5309-295 na biblioteca de cDNA da variedade FT-Cristalina, esta foi analisada por hibridização com o fragmento de 295 pb. As condições de hibridização, temperatura e lavagens, foram testadas previamente por meio de um “Dot Blotting”. A temperatura que proporcionou a melhor condição de hibridização foi 65°C e a melhor condição de lavagem se deu com SSC 0,1X e SDS 0,1%.

Quatro sinais positivos foram obtidos da análise de 5×10^5 placas de lise de fagos recombinantes por meio do “screening” do banco de cDNA. Os fagos recombinantes foram denominados: A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54. Tem sido proposto que as similaridades estruturais entre os genes de resistência podem ser usadas para identificar outros genes de resistência que tenham seqüências comuns (STASKAWICZ et al., 1995). MARTINS (2000) isolou uma seqüência homóloga a genes de resistência, a partir de um “screening” realizado em uma biblioteca genômica da variedade de soja FT-Cristalina, utilizando um fragmento de RFLP, homólogo a genes de resistência, como sonda. A comparação da seqüência de aminoácidos predita, com outras existentes no “GenBank”, revelou homologia da seqüência isolada com as proteínas “*Cf-2.1like*”

de *Arabidopsis thaliana*, proteína de resistência a doenças homóloga a *Cf-2/Cf-5* de *Hordeum vulgare* e outras proteínas de resistência de *Lycopersicon esculentum*.

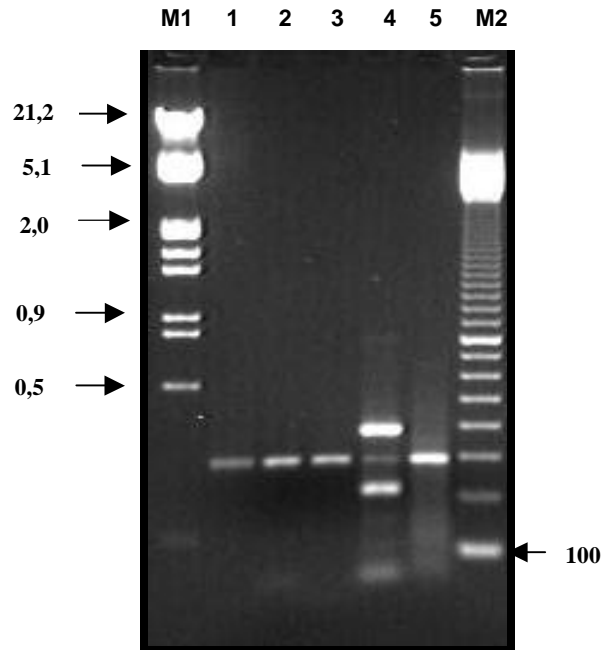


FIGURA 6 - “Screening” baseado na amplificação específica de insertos de fagos recombinantes do Banco de cDNA com os “primers” A53-09A e A53-09D. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em um gel de agarose 1%. Os números na parte superior referem às amostras de DNA de usadas (1 - sonda A5309-295, 2 e 3 – alíquotas de 1 e 5 μ L do banco de cDNA, 4 – DNA de lambda extraído do banco de cDNA e 5 – DNA total de soja FT-Cristalina), M1 ao marcador de tamanho (DNA de λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III) e M2 “100 Base-Pair Ladder” (AMERSHAM PHARMACIA). Os números à direita correspondem ao tamanho das bandas em pb e os da esquerda em kb.

O desenho de “primers” degenerados baseados nas seqüências conservadas dos genes *R* tem permitido a amplificação de seqüências análogas a genes de resistência (RGAs) em milho (COLLINS et al., 1998), *Arabidopsis*

(AARTS et al., 1998), trigo (SPIELMEYER et al., 1998), cevada (LEISTER et al., 1998), feijão (RIVKIN et al., 1997) e melão (GARCIA-MAS et al., 2001). O mapeamento de RGAs é indicado para se encontrar marcadores fortemente ligados a genes de resistência e possivelmente identificar locos de resistência candidatos, mesmo que indiretamente por meio de clonagem posicional (KANAZIN et al., 1996).

Após o isolamento dos clones positivos foi realizada a excisão *in vivo* dos fagomídeos que continham insertos homólogos à sonda A5309-295, permitindo que os clones recombinantes fossem caracterizados como em um sistema plasmidial.

A liberação dos fragmentos de cDNA clonados foi feita pela clivagem do DNA dos plasmídeos recombinantes: A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54, com as enzimas *EcoR* I e *Xho* I; os tamanhos dos fragmentos clonados em cada um destes plasmídeos foram: 1,4, 1,7, 2,0 e 1,6 kb, respectivamente (Figura 7).

Os fragmentos de cDNA clonados foram seqüenciados em ambas as direções e as seqüências de aminoácidos preditas com base nas seqüências de nucleotídeos dos clones foram comparadas com aquelas existentes no “GenBank”. As seqüências parciais ou completas dos clones podem ser observadas nas Figuras 8, 9, 10 e 11 e as principais homologias detectadas estão representadas na Tabela 2.

O clone A5309-28 foi totalmente seqüenciado. Ele contém 1.393 pb e apresenta uma possível ORF que potencialmente codifica um polipeptídeo de 317 resíduos de aminoácidos. A comparação da seqüência de aminoácidos predita de A5309-28, em todas as possíveis ORFs, com outras existentes no “GenBank” revelou homologia com uma proteína H⁺-ATPase de *Arabidopsis thaliana*. Uma região rica em lisina contendo 119 resíduos de aminoácidos está presente na ORF.

Uma das primeiras respostas da célula após elicitação por patógenos é a alteração do potencial da membrana plasmática, provavelmente correlacionada com a ativação/desativação de bombas de prótons, proteínas cinases e fluxo de íons. A ativação de H⁺-ATPases causa hiperpolarização da membrana e

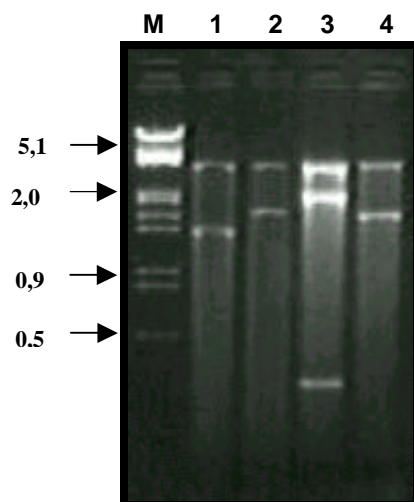


FIGURA 7 - Reação de restrição dos clones isolados do banco de cDNA. Os clones A5309-28 (1), A5309-41(2), A5309-48(3) e A5309-54(4) foram clivados com as enzimas *Eco* RI e *Xho* I para liberação dos fragmentos clonados. M representa o marcador de tamanho (DNA de λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III). Os números à esquerda correspondem ao tamanho das bandas em kb.

acidificação do meio extracelular, enquanto sua inibição leva a uma rápida despolarização e alcalinização do meio extracelular.

Mudanças no potencial de membrana em resposta a elicitores já foram várias vezes reportadas. MAYER & ZIEGLER (1988) demonstraram que a exposição de tecidos de soja a elicitores de *Phytophthora megasperma* f. sp glycinea causou despolarização dentro de dois minutos, seguida de hiperpolarização cerca de dez minutos depois, correlacionada com a atividade do elicitor.

Análise dos eventos iniciais em resposta à exposição ao elicitor (elicítina) secretada pelo fungo *Phytophthora capsici*, foram reportados em cultura de células de tabaco em suspensão. Influxo de Ca^{+2} , modificações no fluxo de outros íons (H^+ , Cl^- , K^+), despolarização da membrana plasmática, produção de AOS, fosforilação de proteínas, acidificação do citosol e mudanças na expressão gênica foram detectadas poucos minutos após a elicitação (BOURQUE et al., 1998). De

maneira similar, células de tomate tratadas com xilanase ou fragmentos de quitina, elicitores fúngicos, também apresentaram aumento no pH extracelular e rápidas mudanças no estado de fosforilação de proteínas (FELIX et al., 1991).

Vanadato, um inibidor de bombas de prótons, quando administrado em cultura de células em suspensão de amendoim e soja, induziu a síntese de fitoalexinas e naquelas de petúnia, induziu a síntese de lignina e fenilalanina amônia liase (STEFFENS et al., 1989).

Com base nestas considerações, presume-se que bombas de prótons possivelmente estejam envolvidas na resposta de resistência por conduzirem à alcalinização do meio extracelular e correspondente acidificação celular. Para tal, a inibição desta ATPase, com conseqüente despolarização da membrana, seria necessária. A entrada de H^+ na célula parece estar associada com o influxo de Ca^{+2} e o efluxo de K^+ . Um mecanismo capaz de inibir bombas de prótons foi reportado por LINO et al. (1998). Eles demonstraram que a fosforilação da proteína H^+ -ATPase, mediada por cinases dependentes de Ca^{+2} , leva à sua inibição. Assim, o influxo de Ca^{+2} , que corre imediatamente após a interação entre o elicitor e o gene *R*, ativaria cinases no citosol que seriam capazes de fosforilar e, conseqüentemente, inibir bombas de prótons, culminando com diminuição do pH no citosol e alcalinização do meio extracelular.

Peroxidases envolvidas na produção de espécies ativas de oxigênio (AOS) após elicitação necessitam de alcalinização do apoplasto para catalisarem a formação de superóxido de hidrogênio, a partir de oxigênio, durante a combustão oxidativa (FALK et al., 1999). Em contrapartida, a acidificação do citosol durante HR permite a formação do radical hidroperóxil (HO_2^-) por protonação de superóxido de oxigênio (O_2^-). Por serem menos polares que os radicais superóxido de oxigênio, os radicais hidroperóxil são capazes de atravessar membranas tão eficientemente quanto os radicais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), levando a danos celulares.

Assim, o clone A5309-28, cuja seqüência é homóloga a H^+ -ATPases, poderia atuar na resposta de resistência por mediar o influxo de prótons através da membrana após a elicitação celular, levando à alcalinização do meio

extracelular e acidificação do citosol, ambas necessárias para efetivação de respostas adicionais envolvidas na defesa.

O clone A5309-41 também foi totalmente seqüenciado e contém 1.737 pb. A predição de todas as possíveis ORFs revelou a presença de uma potencial ORF que codifica um polipeptídeo de 250 resíduos de aminoácidos.

A seqüência de aminoácidos predita revelou similaridade com um transportador de membrana da família dos transportadores que se ligam a ATP, conhecida como transportadores ABC (“**A**TP-**B**inding **C**assette”). Esses transportadores constituem uma superfamília de proteínas que apresentam domínio de ligação a ATP e estão presentes em todos os organismos vivos. São capazes de translocar diferentes solutos através de membranas biológicas, acoplado à hidrólise de ATP. Estão envolvidos em diversos processos biológicos como transporte de nutrientes, secreção de proteínas, transdução de sinal, apresentação de antígenos, detoxificação celular, resistência a drogas e patogênese.

Os transportadores ABC apresentam uma ou duas cópias de dois elementos estruturais básicos: um domínio integral de membrana (TMD), contendo múltiplos espaçadores transmembrana, e um domínio de ligação a ATP orientado para o citosol (NBF) (HIGGINS & SHARP, 1992). O domínio NBF é característico desta superfamília, apresentando cerca de 30 a 40% de identidade entre todos os membros. Este domínio está presente na potencial ORF de A5309-41 (Figura 9).

Em mamíferos a família dos transportadores que se ligam a ATP está extensivamente caracterizada. Transportam ampla gama de compostos, incluindo drogas quimioterapêuticas e proteínas. O *MDR1*, um transportador ABC identificado em humanos, é capaz de exportar compostos tóxicos para fora da célula, sugerindo uma função fisiológica de proteção celular. Camundongos que tiveram este gene mutado apresentaram hipersensibilidade a compostos xenobióticos (KLEIN et al., 1999).

Em plantas os poucos transportadores ABC caracterizados estão relacionados principalmente com a eliminação de compostos tóxicos, tanto endógenos como exógenos, do citosol. Compostos como flavonóides e

xenobióticos (herbicidas) quando conjugados à glutathione são transportados para o vacúolo (seqüestro), ou para o meio extracelular (extrusão) por meio de transportadores ABC. A ligação destes compostos a glutathione é catalisada pela glutathione-S-transferase (GST). Um transportador ABC, identificado em *Arabidopsis*, MRP1, parece translocar exclusivamente compostos conjugados à glutathione, enquanto que MRP2 transportaria catabólitos clorofílicos não conjugados à glutathione. A detoxificação de compostos endógenos e exógenos citotóxicos se inicia com a ativação dos mesmos pela adição ou exposição de grupos funcionais mediada por enzimas específicas, seguida da conjugação desses compostos à glutathione. Finalmente, eles são eliminados do citosol para o meio extracelular ou seqüestrados em compartimentos celulares pela atuação dos transportadores ABC (REA, 1998).

Vários fatores que levam ao aumento dos níveis dos transcritos para GST, como ferimentos, metais pesados, ataque de patógenos e etileno, também promovem a formação de AOS, o que leva a inferir o papel de GST na detoxificação de compostos reativos do citosol, mediada por transportadores ABC. Em cultivo de células em suspensão de *Arabidopsis*, os níveis de expressão de *AtMRP3* e *AtMRP4*, transportadores ABC, aumentaram de quatro e três vezes após a adição de um inibidor de catalase e de um inibidor da superóxido dismutase (SOD), respectivamente (SANCHEZ-FERNANDES et al., 1998).

Durante HR ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio que desempenham importantes papéis na resposta de defesa, como alterações estruturais da parede celular, indução de genes de defesa, desbalanço do potencial redox e indução de morte das células hospedeiras no sítio de infecção. Estes radicais podem, por si só, ser tóxicos para as células hospedeiras em altas concentrações, além de levarem à formação de outras moléculas reativas e causarem dano oxidativo ao DNA. Em condições apropriadas, H_2O_2 e HO_2^- podem converter os ácidos linoléico, linolênico e araquidônico em peróxidos lipídicos, que atuam como moléculas sinalizadoras, impondo danos à membrana plasmática. Deste modo, em determinada fase da resposta de resistência, danos são impostos não somente ao patógeno, mas à célula hospedeira, então, crucial para a planta

que rotas de controle da resposta de resistência e proteção da célula vegetal sejam ativadas.

Os produtos oriundos da peroxidação lipídica e do dano oxidativo do DNA devido a AOS podem ser detoxificados pela glutathione-S-transferase. Em mamíferos esses produtos são substratos para GSH (BERHANE et al., 1994). Deste modo a potencial proteína codificada pelo clone A5309-41, cuja seqüência apresentou homologia a um transportador ABC de *Arabidopsis*, pode estar envolvida na resposta de defesa por participar nos processos de detoxificação envolvendo a proteína glutathione-S-transferase, neste caso a potencial proteína estaria presente na membrana do vacúolo, ou no transporte de compostos fitopatogênicos tóxicos para o meio extracelular, embora essa possibilidade ainda não tenha sido testada.

A potencial proteína poderia, por outro lado, estar envolvida na resposta de defesa mediando a liberação de fitoalexinas no citosol imediatamente após a infecção, contribuindo para a contenção do patógeno (LI et al., 1997). Fitoalexinas são isoflavonóides com atividade antimicrobiana que podem ser conjugados à glutathione e acumulados no vacúolo quando translocados por transportadores ABC. Durante a HR, além da síntese *de novo* de fitoalexinas, há uma rápida liberação dessas proteínas antimicrobianas acumuladas do vacúolo, o que garante uma resposta rápida de resistência associada com todos os outros processos ativados após a infecção da planta por fitopatógenos.

O clone A5309-48 foi parcialmente seqüenciado, apenas 1.307 pb dos 2.048 pb esperado, baseado no tamanho do fragmento de restrição liberado do vetor UniZAP. A predição da seqüência de aminoácidos revelou a presença de uma ORF que potencialmente codifica uma seqüência de 224 resíduos de aminoácidos. A comparação dessa seqüência de aminoácidos com as existentes no "GenBank" apresentou similaridade com uma proteína lipoxigenase (LOX1), expressa em folhas de tabaco após indução por jasmonato.

Lipoxigenases catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos insaturados que contêm um grupo cis-1,4-pentadieno. Os ácidos linoléico e linolêico, comuns

em fosfolípídeos de membranas vegetais, são substratos de LOX (EIBEN & SLUSARENKO, 1994).

Clone 28

```

R R Y R * A * Y R I R G R V D D G V K K
-3 cgacggatcgcgataagccttgatcgaattcgcgccgcgctcgacgatggagtgaaagaaa -62
E R E A I R S K I K Q I D D A L K A I D
-63 gagagagaagcgattcgggtcctcaaaatcaagcaaatgatgatgactgaaagccatagac -122
K D I Q S L Q E E L T A V S Q K R D K A
-123 aaggatatccagtcctctacaggaggaactgacagctgtttctcagaagagggacaaggct -182
F E S M Q Q L R K Q R E E G N T Y F Y Q
-183 tttgagagcatgcagcagctaagaaaacagcgcgaggaggggaaacacctatttctaccaa -242
S R T V L N K A R E L A A K K D I N A L
-243 agtcgtacagttctgaacaaagcagggagctggctgcaaagaagatattaatgctctt -302
D G S F T D R R L R N L W H S G T R H K
-303 gatggaagtttcacagacagggaggttgagaaatattatggcactctggaacaaggcaca -362
A F R N D Y E K R I L A S L D M R Q L S
-363 gcatttaggaatgattatgaaaaagaattttggcctcattggatgacgacagttgag -422
R D G R M R N P D E K P I L E E P K P A
-423 cgggacggacggatgaggaacccggatgaaaagccaatcctggaagaacccaaacctgct -482
E A E A L P K T F T K Q P K E E P K P S
-483 gaagctgaagcattacccaaactttcacaaaacagccaaaggaggagcctaagccttct -542
P Q E T L P A Q K E S K N K G R D L K S
-543 ccacaagaactttgcctgctcagaagaatccaaaaacaaggggagggatttgaaatcc -602
K P E S K D V A E T D E Y E F K N P Q K
-603 aaaccggagagtaaggatgtagcagaaactgatgaatatgaatttaaaatccccaaaag -662
E A P A K E C E I D P A K L K E M K R E
-663 gaggccctgccaagagtgatgaaatcgatccagcaaaagctaaaagagatgaaaagagag -722
E E I A K A K Q A L E R K K K L A E K A
-723 gaggagattgcaaaggcaaaagcaggccttgaaaagaagaagaagttagcagagaaagct -782
A A K A A I R A Q K E A E K K L K D R E
-783 gcagccaaagcggccatcagagcacaacaaaggaagctgagaagaagcttaaggaccgtgag -842
K K A K K K S G A A A V A N P E D E P K
-843 aagaaagcaaaagaagaatcaggtgctgcagctgtggccaacctgaggatgaacccaaa -902
D E V V E A T E P E K V N D D V Q V L A
-903 gatgaagttgtcgaggctacagagccagaaaaggttaacgatgatgtccaagtcctggct -962
P V K E K V Q K E S G I R S R G R A R G
-963 ccagtgaaagaaaaggtcctcaaaagagagtgatggcctcaggtccaggggcccagcaagag -1022
P D S I P K A I I K R K K S N N Y L I W
-1023 ccagactcgattcctcaaaagctattatataacggaagaagctcaacaattacctgatagg -1082
A A A A A L L V L L L A V L G Y I Y L F
-1083 gctgcagctgcggctttgctagtcctcctggtggcagtgcttggatcacatctatctttc -1142
* K A * M * K E L * N Q F S E W V A R F
-1143 tgaaaagcttagatgtagaaggagctgtgaaaccaattttctgagtggtggctaggttt -1202
V R * H K L C S C F Y T S S W E N R * N
-1203 gtgaggtagcataagttatgttcatgtttctatacatcctcttgggagaatagatgaaac -1262
T L C C A * L L L W G E N C M H T F S F
-1263 acactttgtgtgcttagctcctgctttggggagaaaactgcatgcatacatcttagcttt -1322
D Y V L S K F C S D F I Y * I C F * K V
-1323 gactatgtactttcaaaatttgttcagatcttactgaatcttctcaaaaagtc -1382
D A A
-1383 gacgcgccgc -1393

```

FIGURA 8 - Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos predita para o clone A5309-28. A seqüência de nucleotídeos está representada em letras minúsculas enquanto a seqüência predita de aminoácidos em letras maiúsculas. A principal ORF está sublinhada, sendo seu início destacado com a letra M em negrito. A região rica em lisina está indicada em negrito e itálico. O símbolo * representa possíveis códons de parada.

Clone 41

```

I G G R V D E E P * A L S C S G F Y S H
2   attggcggccgcgtcgacgaagaaccctaagccctctcttgcctgggattttactctcac 61
E I R D * R W C L T R A R R R L R R R R
62   gagattagagattgaagatgggtctgacgcgagcaagaagaaggctgcgcagaagaagg 121
R R Q R P R E E A K Q Q L L R R K R R R
122  cggcggcagcggccaagagaggaggcaagcagcagctgcttcgctgaaaacgacgtcgt 181
R R R P P T S L P T E L G K F R Y P I E
182  cggagaaggccgccaagccttgccaacggaattggggaattcagatatccgatcgaa 241
P A P V S S A R I L F P G I L G * N L C
242  cctgcaccggtgctcctctgctcgatcctctttccaggatattaggatagaatctctgt 301
Q L L F M D M I * * L I P N W S * I M E
302  cagttacttttcatggacatgatttgatagttgattccgaattggagctaaattatggaa 361
R R Y G L L G L N G C G K S T L L T A I
362  agacgttatggcttgcctggattaaatggttgtgggaagtctaccctgcttacggctata 421
G C R E L P I P D H M D I Y H L T R E I
422  ggttgcgagagctacattccagaccacatggatatttatcaccttaccagggaaatt 481
E A S D M S A L E A V I S C D E R L R
482  gaagcctctgacatgtctgcattggaggtgtcataagctgtgatgaggaaggttgaga 541
L E K E A E A L A A Q D D G G G E A L E
542  ttggagaagaagctgaagccttggcagcgcaggatgatgggggtggggaagctttgaa 601
R I Y E R L E A I D A S T A E K R A A E
602  cgtatttatgaacgattggaagcattgatgcatcaactgcagaaaagcgtgctgctgaa 661
I L F G L G F N K Q M Q A K K T R D F S
662  attttattggcttggtttcaacaagcagatgcaagcaaagaagacacgcgattctct 721
G G W R M R I A L A R A L F M N P T I L
722  ggtggttggagaatgaggattgctttagcagctgctctatttatgaaccctaccatcct 781
L L D E P T N H L D L E A C V W L E E N
782  ttacttgatgaaccaaccaatcaccttgatttggaaagccttgtgtggctcgaagagaat 841
L K K F E R I L V V V S H S Q D F L N G
842  ctgaagaagttgaacgtattctggttggtttcacactcacaggatttcttaaatggt 901
V C T N I I H M Q N K K L K L F T G N Y
902  gtctgcacaaatcatccacatgcaaaacaagaagctgaaactcttcaactggtaattat 961
D Q Y V Q T R A E L E E N Q M K Q Y K W
962  gatcaatatgttcagacacgtgctgaactggaagagaaccagatgaagcagtaacaatgg 1021
E Q E Q I A S M K E Y I A R F G H G S A
1022  tgacaggagcaaatgcctcgatgaaggaatacattgcccgatttggctatggatcgaca 1081
K T S P P S S E * R E N S C K N E A V D
1082  aaaactagcccgcgaagctcagagtaaaagagaaaactcttgcaaaaatgagggcgtggac 1141
L Q R R W * E T K F W Y S A L L M W E N
1142  ttgcagagaagtggtgaagagacaaagtttggatttccgcttggatggtgggaaac 1201
F P R L S S S L L R * H L G T L L I I *
1202  ttccccgcctgtcctccagtttggtaggtgacatttgggtacactcctgataaatctga 1261
S T R T L T L G L I * T L G L L W L D P
1262  tctacaagaaccttgactttgggttggatttagactctaggattgctctggttggaccca 1321
M E L G R V R Y * S * * L V I W N L * M
1322  atggagctgggaagtagcttactgaagctaattgactggtgatttggaaacctctgatg 1381
A W F D A T I T F G L H N F T S T W L R
1382  gcatggttcgacgccacaatcacctcggattgcacaatttcaccagcacttggctgaga 1441
S * T W K C L P S S I * * K N T L E T R
1442  agctagacttggaaatgctgocctccagtatatgataaagaataacctggaaacgagg 1501
R R G * E Q P L G N L D C L A K R R S C
1502  aggagaggatgagagcagccattgggaaatttggactgtctggcaaagcgcaggtcatgc 1561
L * R I Y P M G R G A V * Y S H G * L I
1562  ctatgaagaatttatccgatggcagaggagccgtgtgatattcgcaggttagcttata 1621
D S L T C Y L L D E P T N H L D I E T I
1622  gacagcctcacctgctaccttttggatgagccaacgaaccatttggatatagaacaatt 1681
D S L A E A L N E W D G G M C L L A
1682  gactcattggctgaggcattgaatgaatgggatggtggcatgtgctttagccat 1737

```

FIGURA 9 - Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos predita para o clone A5309-41. A seqüência de nucleotídeos está representada com letras minúsculas enquanto a seqüência predita de aminoácidos com letras maiúsculas. A potencial ORF está sublinhada, sendo seu início destacado com a letra M em negrito. O domínio característico dos transportadores ABC (FSGGWRMRLALARAL) está destacado em negrito e itálico. O símbolo * representa possíveis códons de parada.

Clone 54

```

R P R R P L S S Q N H I I L F H L N F P
1  cggccgcgctgacctctatcttcccaaaatcatataattctctttcatctgaattttccc 60
F Q I S S F E V F V V L C I M E M E R V
61  tttcaaatctcttcttgaagttttcgtagttctctgcatcatggagatggaacgcgctc 120
F E F P H T H M D R R P R K R A R L G W
121  ttcgagtttctcactcactgcatggatcggcgcccgagaaagagagcgagattgggctgg 180
D I P E V P K A Q V G L F C G Q D V G T
181  gacatccctgaggtcccccaaggctcaggtaggattgttttgggacaagatggtgggact 240
I S S F A P S R G P S E N T T S S L F V
241  atttcaagctttgctccttcaaggggtccctcagaaaataccactagttctctattgtt 300
K P V A R N G S P P W R D D D K D G H Y
301  aagccagttgctcgaaatggttctcccccttggcgagatgatgacaaagatgggcattac 360
M F A L G E N L T S R Y K I H S K M G E
361  atgtttgcgcttgagaaaaatttaacttctcgtataagatacatagcaaaatgggtgaa 420
G T F G Q V L E C W D R E R Q G N G C R
421  ggaacttttgggcaggtcttagaatgctgggatagagaaaggcaaggaaatggttgcct 480
F N C P L V L S K Y R E A A M I E I E V
481  aaaaattgtccgctggtattaagcaagtatcgagaagcagccatgatagaaatggaggtg 540
L Q Q L G K H D K G G N R C V Q I R N W
541  ttgcaacagcttggtaaacacgataaaaggaggcaatcgttgtgtgcaaatcgggaactgg 600
F D Y R N H I C I V F E K L G P S L Y D
601  tttgactatcgtaaatcatatctgtattgtgtttgagaaaactggaccaagcttatacgat 660
F L R K T L I I P F H F P L D L V R G D
661  tttcttcggaaaactaattatccccttccatttcccattggatcttgcgctggagat 720
W Q T T I G M X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
721  tggcagacaactattggaatgnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn 780
X X X X X X X X X * F T R V C Q S S L T T
781  nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnntagttcaccagatgtcaaagttccctgactacc 840
R V H L E S P K V P I S R E F P K S K C
841  agagttcatctagaatcacccaaggttcttatttcaagagagttcccaaatccaagtc 900
Y K G L * F W Q H H L * A R R S E L H C
901  tataaagggttatgattttggcagcaccacttatgagcagagaagatcagaattacattgt 960
I N S S L * G S * S Y P W T W L E L S M
961  atcaactcgtcattatagggtcctgaagttatccttggacttggctggagctatccatg 1020
* Y L E C G M Y L G * V M H G R S F V S
1021  tgatatctggagtggtgggatgtatcttgggtgagttatgcacggcgagcctttgttca 1080
D S R K F G A S C H D G K G T W S I T T
1081  gactcacgaaaatttggagcatcttgccatgatggaaagggtacttgggtccattaccaca 1140
A H V E E S R P T C * E V C * K G * I G
1141  gcccatgttgaagagatcgaccgacatgtagaagtagttagaaggggtagattgga 1200
L A * G C N L K G E Y Q S C N E A S * A
1201  ctggcctgagggtgcaacctcaaggagagatcaaaagctgtaatgaagcttcttagct 1260
S E A L * C S M * I I Q L A I S Y I S C
1261  tcagaagccttgaatgcagcatgtagatcattcagctggcgatctcatacatctcttgc 1320
R G Y L D M T P L K D L Q P R K L L D I
1321  aggggttacttagatatgaccctctgaaagacttacagccaaggaagctcttagacatt 1380
P S L * E I N L E D N S L S K L L H H R
1381  cttctttatgagagatcaatttagaagataattcactttctaagctgctgcatcctg 1440
* P S * G I N F R R C G Q M N S P G * W
1441  tgaccttctaaaggttaactttagaagatgtgggcaaatgaactcacctgggtgatgg 1500
L V F P A A V F T P A E K S S F R N F *
1501  ctgggttttctgcagctgtcttactcctgctgaaaaatcctcatttaggaattttga 1560
I D P N S K Y R R K K C * C C G E N C S
1561  attgatccgaattcaagtagacaagaaaaaatgctaattgtgtggtgaaaattgtagc 1620
F V L T N L S L T R A A N
1621  tttgtgctcacaaaatttaagtctgacgcgagccgcaat 1659

```

FIGURA 11 - Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos predita para o clone A5309-54. A seqüência de nucleotídeos está representada em letras minúsculas enquanto a seqüência predita de aminoácidos em letras maiúsculas. A principal ORF está sublinhada, sendo seu início destacado com a letra M em negrito. O símbolo * representa possíveis códons de parada. A região não seqüenciada está representada por n's. O domínio, característico da família LAMMER cinases, está parcialmente representado em caixa, enquanto o domínio cinase está destacado em negrito e itálico.

Tabela 2 - Análise de similaridade entre as seqüências deduzidas de aminoácidos dos clones A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54 e seqüências depositadas no “GenBank”.

Clone	Clone do “GenBank”	Acesso no “GenBank”	Espécie	Valor P
A5309-28	Bomba de prótons	NP194480	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2e ⁻⁴⁴
A5309-41	Transportador ABC	BAA94511	<i>Populus nigra</i>	e ⁻¹⁶⁴
	Transportador ABC	BAB10100	<i>Arabidopsis thaliana</i>	e ⁻¹⁶⁴
	Transportador ABC	NP005683	<i>Homo sapiens</i>	e ⁻¹⁶⁴
A5309-48	Lipoxigenase vlxC	TO 6190	<i>Hordeum vulgare</i>	2e ⁻⁹⁸
	Lipoxigenase	S18612	<i>Glycine max</i>	2e ⁻⁹⁷
	Lipoxigenase	CACO4380	<i>Pisum sativum</i>	5e ⁻⁹⁴
A5309-54	Cinase PK12	TO 41 25	<i>Nicotiana tabacum</i>	e ⁻¹⁵²
	Proteína cinase	BAB67874	<i>Oryza sativa</i>	e ⁻¹³³
	“LAMMER kinase-like”	AF334941	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3e ⁻³⁷

Durante a reação de hipersensibilidade radicais de peróxido de hidrogênio, produzidos durante a combustão oxidativa, são capazes de induzir a peroxidação lipídica mediada por lipoxigenases, gerando precursores do ácido jasmônico, tendo como substrato os ácidos linoléico e linolênico da membrana plasmática. A peroxidação dos lipídeos da membrana, durante HR, foi demonstrada por KEPPLER & NOVACKY (1996). Além disso, aumento na atividade enzimática de LOX tem sido observado em várias interações incompatíveis (SLUSARENKO et

al., 1993). Em folhas de tomate infiltradas à vácuo com células de *Pseudomonas*, a indução da atividade de LOX, aumento na síntese de mRNA e da proteína sofreram modificações que correlacionaram com o estabelecimento de HR (KOCH et al., 1992).

Desta maneira A5309-48, homólogo a lipoxigenases, poderia atuar na resposta de resistência por gerar moléculas sinalizadoras como JA, metil-JA ou peróxidos lipídicos, os quais coordenadamente podem amplificar respostas específicas. Sua atividade pode ainda causar danos irreversíveis à membrana levando à liberação do conteúdo citoplasmático, que pode culminar com a morte da célula vegetal no sítio da infecção (KEPPLER & NOVACKY 1996). Alternativamente, as reações catalisadas por LOX podem resultar na produção de metabólitos secundários tóxicos, voláteis e não voláteis, que podem diretamente inibir a ação do patógeno (CROFT et al., 1993).

O clone A5309-54 foi parcialmente seqüenciado, aproximadamente 62 nucleotídeos dos 1.569 pb não foram seqüenciados. A predição da seqüência de aminoácidos revelou a presença de uma ORF que potencialmente codifica uma seqüência de 234 resíduos de aminoácidos. Sua comparação com seqüências contidas no “GenBank” revelou similaridade com a proteína cinase PK12 de tabaco, induzida por etileno. Esta proteína pertence à família das proteínas cinases serina/treonina, conhecida como “LAMMER”, presente em eucariotos e que fosforilam proteínas envolvidas na regulação do mecanismo de processamento e metabolismo do mRNA. Os subdomínios catalíticos, essenciais para a fosfotransferência e interação com o substrato, são aproximadamente 100% idênticos entre todos os membros desta família, embora a região N-terminal, não catalítica, seja altamente divergente. Um desses subdomínios, presentes em todos os membros, **EHLAMMERILG**, é característico e nomeia a família, e também está parcialmente presente no clone A5309-54. Um domínio cinase também foi identificado dentro da potencial ORF codificada pelo clone A5309-54 (Figura 11).

A fosforilação de proteínas regula inúmeros processos celulares em todos organismos vivos. Em plantas eventos de fosforilação participam de vários

processos fisiológicos, como sinalização hormonal, resposta à luz, desenvolvimento de folhas e flores, e interações entre planta e patógenos (BUCHANAN et al., 2000).

Estudos envolvendo fosforilação e inibidores farmacológicos têm demonstrado que cinases e fosfatases são cruciais para a ativação dos eventos iniciais das respostas de defesa (SCHEEL, 1998).

Proteínas cinases CDPK e MAPK já foram reportadas como componentes da cascata de transdução de sinal nas respostas de resistência. ROMEIS et al. (2000) identificaram a presença de uma CDPK que era induzida em cultura de células de tabaco em suspensão, expressando o gene *Cf9* de tomate, após a elicitação com fluidos intercelulares contendo o fator de avirulência *Avr9*. A ativação da proteína ocorre por fosforilação e de maneira independente da cascata envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio.

LIGTERINK et al. (1997) isolaram uma MAP cinase que é ativada de maneira independente da combustão oxidativa, porém dependente da ativação de canais de íons na membrana, em cultura de células de salsa em suspensão, após indução com um elicitor de *Phytophthora sojae*. Após sua ativação, a proteína é translocada para o núcleo onde provavelmente interage com fatores de transcrição, conforme foi demonstrado por imunofluorescência, indicando a provável existência de rotas que levam à ativação dos genes de defesa, independente da combustão oxidativa envolvendo proteínas cinases.

Os genes *Pto* de tomate e o *Xa21* de arroz também são exemplos do envolvimento de cinases na ativação das respostas de resistência. *Pto* pertence à classe dos genes *R* que possui apenas o domínio cinase. Esse gene codifica uma proteína cinase do tipo serina/treonina. Os dados experimentais gerados até hoje indicam que a proteína *Pto* participa de um complexo protéico, junto com *Prf*, ancorado na membrana que reconhece e interage diretamente com o elicitor, *Avrpto* (TANG et al., 1996). Após sua ativação, *Pto* é capaz de sofrer autofosforilação e interagir com a cinase *Pti1*, e com os fatores de transcrição *Pti4*, 5 e 6, que possuem um domínio de ligação a regiões promotoras altamente conservado nos genes que codificam proteínas relacionados à patogênese. Tanto

Pto como *Pti1* podem estar envolvidos na ativação destes fatores de transcrição por fosforilação.

O gene *Xa21* confere resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e codifica uma proteína transmembrana com domínios LRRs extracitoplasmáticos e um domínio celular que possui atividade cinase serina/treonina (SONG et al., 1995). *Xa21* possui o domínio que seria responsável pelo reconhecimento do patógeno, o domínio LRR, e a porção com a atividade de cinase, que ativaria a via de transdução sinal.

A proteína cinase PK12, à qual o clone A5309-54 apresentou alta homologia, é induzida por etileno (SESSA et al., 1996). Em um RT-PCR diferencial com mRNA extraído de folhas de tabaco tratadas e não tratadas com etileno, utilizando oligonucleotídeos correspondentes a domínios conservados serina/treonina, presentes em proteínas cinases.

Durante interações entre planta e patógenos a biossíntese de etileno aumenta rapidamente (YANG et al., 1984), e a síntese de proteínas relacionadas à patogênese é induzida (ECKER, 1995). Em tabaco o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, em resposta a etileno, mostrou ser mediado por eventos de fosforilação e requer a presença de Ca^{+2} (RAZ & FLUHR, 1993).

A ativação de PK12 por etileno sugere o envolvimento desta proteína nas rotas de transdução de sinal envolvendo etileno, possivelmente coordenando mecanismos gerais de transcrição ou de “splicing”, como ocorre com outros membros da família LAMMER. O papel de PK12 na resposta a etileno em plantas necessita ser mais bem examinado em relação aos outros componentes da rota de sinalização do etileno já identificados.

Embora haja alta identidade entre os membros da família LAMMER, essas cinases apresentam distinta preferência por substrato. Estudos de especificidade de substrato envolvendo três cinases LAMMER (CLK2 de humanos, DOA de *Drosophila* e PK12 de *Arabidopsis*), revelou que ambas são capazes de fosforilar proteínas SR, envolvidas nos mecanismos de “splicing”, e histonas. Somente PK12 foi capaz de fosforilar o receptor β -lamina, um componente do envoltório nuclear.

Assim, A5309-54, homólogo a uma cinase induzida por etileno, pode estar envolvida na fosforilação de proteínas relacionadas com rotas de transdução de sinal induzidas por etileno, como ferimentos e elicitação por fatores de avirulência.

Embora todos os quatro clones isolados do banco de cDNA tenham apresentado seqüências homólogas a genes envolvidos direta ou indiretamente na resposta de resistência, não ficou claro por que eles hibridizaram de modo específico com o fragmento de 295 pb utilizado como sonda. Por esse motivo, foi determinado o grau de similaridade/identidade entre as seqüências nucleotídicas dos clones positivos e a fragmento A5309-295, utilizado nas hibridizações. Para tal, as seqüências nucleotídicas foram alinhadas com o auxílio do Programa *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994), sendo que o mínimo de homologia determinado para o alinhamento foi de 30%. Comparações entre os potenciais domínios protéicos presentes nas ORF's dos clones positivos com os preditos para o fragmento A5309-295, também foram feitas.

Todos os quatro clones apresentaram homologia superior a 30% quando comparadas com o fragmento A5309-295, utilizado como sonda. O alinhamento entre as seqüências nucleotídicas dos clones A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54 com a sonda A5309-295 pode ser observado nas Figuras 12, 13, 14 e 15. A maior homologia (53%) foi observada entre a seqüência do clone A5309-54 e a sonda.

A seqüência predita de aminoácidos da sonda A5309-295 contém uma ORF de 56 resíduos de aminoácidos e apresenta duas regiões conservadas: um domínio de meristoilação (posições 50 a 55 na ORF), o que indica uma provável localização na membrana, e um sítio de fosforilação por uma proteína cinase caseína II (posições 23 a 26 na ORF), conforme apresentado nas Figuras 16 e 17.

Todos os clones isolados também apresentam um sítio de fosforilação por uma proteína cinase C e por uma proteína cinase caseína. Com exceção do clone A5309-28, todos os outros clones isolados também apresentam um domínio de meristoilação. A ocorrência de sítios e domínios similares nas seqüências predita

```

A5309          . . .-----TATC
28_completo   . . .TACCTCACAACCTAGCCACCCACTCAGAAAATTGGTTTCACAGCTCCTTCTACATC
                ***

A5309          TCAGACTCTCCAATGAGCCTAG-GAAGCTTGGTATTGG----AGTAAGAACAATAATT
28_completo   TAAGCTTTTCAGAAAAGATAGATGTATCCAAGCACTGCCAACAGGAGGACTAGCAAAGCC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A5309          TGAACTCAAGTCCAAACGATTCAAATATTTTGTTC AAGCAAAGAAGGACTAATCTCTCC
28_completo   GCAGCTGCAGCCATATCAGGTAATGTTAGACTTCTTCGTTTAATAA-TAGCTTTTGG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A5309          ACTCAACTCC--CTATAGGGAGAGCCCGCAGGTGTGTC AAGATTGATTTCCATGACTTT
28_completo   AATCGAGTCTGGGCTCTTGCTCGGCCCTGGACCTGATGCCACTCTCCTTTTGGACCTT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A5309          ACCTGTGTTGTTGCAGTGAACCCCTGGCCATGTACAGCAATCCGATTTGTCA---GACC
28_completo   TTCCT--TCACTGGAGCCAGGACTTGGACATCATCGTTAACCTTTTCTGGCTCTGTAGCC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A5309          ACGATGAAAGCCTGTTT-GAAGGGTCTGC----TAGTCCATGCTTGAAGCTGAGGAGTGC
28_completo   TCGACAACCTTCATCTTTTGGTTTCACTCAGGGTTGGCCAAGCTGCAGCACCTGATTTT
                *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A5309          ATTCCT--TTCCTTCTCGCTG-----
28_completo   TTCTTTGCTTTCTTCTCACGGTCTTAAGCTTCTTCTCAGCTTCTCTTTTGTGCTCTGATG
                * * * * * * * * * *

A5309          -----
28_completo   GCCGCTTTGGCTGCAGCTTTCTCTGCTAACTTCTTCTTTTCCAAGGCCTGCTTT...

```

FIGURA 12 - Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do clone A5309-28 e da sonda A5309-295. As seqüências foram alinhadas pelo programa *ClustalW*; as posições de idêntidades estão destacadas em azul.

de aminoácidos dos clones positivos e da sonda pode indicar a presença de regiões homólogas importantes entre as seqüências de DNA, bem como similaridades estrutural e funcional da proteína.

Proteínas meristoiladas apresentam um radical miristato (ácido graxo de 14 carbonos) ligado covalentemente na região N-terminal da proteína. Em geral esta reação é irreversível e ocorre pós-traducionalmente, sendo catalizada por uma proteína N-meristoiltransferase. Esta reação permite à proteína realizar interações com a membrana plasmática, bem como com outras proteínas (FARAZI, 2001). Este domínio está presente na proteína de avirulência *AvrPto* e é requerido tanto para a avirulência quanto para a virulência do patógeno, embora mutações neste domínio não interferiram na capacidade de interação da proteína *AvrPto*

```

A5309          . . . -----
41_completa    . . . GCCTCTGACATGTCATTGGAGGCTGTCATAAGCTGTGATGAGGAAAGGTTGAG

A5309          -----TATCTCAG
41_completa    ATTGGAGAAAGAAGCTGAAGCTTTGGCAGCGCAGGATGATGGGGTGGGAAGCTCTTGA
                                     ***

A5309          ACTCTCCAATGAGCC--TAGGAAGC--TTGGT--ATTGGAGTAAGAACAATAAAT-TTGA
41_completa    ACGTATTTATGAAACGATTGGAAGCCATTGATGCATCAACTGCAGAAAAGCGTGTCTGTA
**          **** * * **** * * * * *          **** * * * *

A5309          ACTCAAGTCCAAAC--GATTCAAATATTTTAGTTCAAGCAAAGAAG-AC-TAATCTCTC
41_completa    AATTTTATTTGGTCTTGGTTCAACAAGCAGATGCAAGCAAAGAAGACACGCGATTCTC
* *          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A5309          CACTCAACTCCCTATAGGGAGAGCCCGCAGGTGTGTCAAGATTGATTTCCATGACTTTAC
41_completa    TGGTGGTTGGAGAATGAGGATTGCTTTAGCACGTGCTCTATTTATGAACCTACCATCCT
          *          ** * * * *          **          * * * * *

A5309          CTGTGTTGTTGCAAGTGAACCCTGGCCATGTACAGCAATCCGATTTGTGAGACCAGATG
41_completa    TTACTTGATG-AACCAACCAATCACCTTGATTTGGAAGCTTGTGTGGCTCGAAGAGA
          *   * * * * *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *

A5309          A---AAGCCTGTTTGAAGGTCTGCTAGTCCATGCTTGAAGCTGAGGAGTGCATTCTTT
41_completa    ATCTGAAGAAGTTTGAACG-TATTCTGGTTGTGGTTTCACTCACAGG---ATTCTCTT
          *   *   * * * * * * * * * *   * * * * * * * * * *

A5309          CCTTCTCGCTG-----
41_completa    AATGGTGTCTGCACAAATATCATCCACATGCAAAACAAGAAGCTGAAACTCTTCACTGGT
          *   *   * *

A5309          ----- . . .
41_completa    AATTATGATCAATATGTTTCAGACACGTGCTGAACTGGAAGAGAACCAGATGAAGC . . .

```

FIGURA 13 - Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do clone A5309-41 e da sonda A5309-295. As seqüências foram alinhadas pelo programa *ClustalW*; as posições de idêntidades estão destacadas em azul.

com o produto do gene *R Pto*. No entanto, apenas em plantas transgênicas que expressavam a proteína *AvrPto* selvagem, foi detectada sua presença na fração da membrana, enquanto a proteína mutada na fração solúvel das células hospedeiras (WHITE et al., 2000). O gene de resistência *Pto* também apresenta o domínio de meristoilação e é conhecida sua interação com a membrana plasmática.

Sendo assim, o isolamento dos clones poderia ser justificado pela presença de regiões similares nas seqüências preditas de aminoácidos dos clones positivos e da sonda, e potencialmente nas seqüências de DNA, que estão

48_completa	...	GAAGACTATTACACCAAAGTTTCAGACCCTTATTTGACCTTTCTGTTATAGAAATCT	
A5309	...	-----	
48_completa		TGTCAAGGCATGCATCTGATGAGGTGTACCTTGGGGAGAGGGACAATCACTACGCTACGA	
A5309		-----	
48_completa		CAGTGAGGTGGAAGACTTGTGCGACGCGGCCCAATTCGATATCAAGCTTATCGATAACCG	
A5309		-----CATTCCTTTCCTTCGCTG	
			* * * * *
48_completa		TCGACNN	
A5309		CAAGTCATATTGAGCCTTGCTGCCTTGCTTGCACCTGAAGTGGAGAGTTGTTGCAGTGGAC	
48_completa		NN	
A5309		AATATCAAGAGAAGAACATGAGTTGCATATAGCACTGCCATGAAGAAGAAGGAAAACGAA	
48_completa		NN	
A5309		AAAGGTTGAATCCACAATTTCTGGTTCACGGTTGGTATTACTACTAACAATGCCTATA	
48_completa		NN	
A5309		GC GGCCGCGTCGACAGATCATACATAGTAGTGTGTG	
		TAGGATATATACCATAGAAGGGTTTGCATTTAAAATTTTATTCCACTAATGGTGGTGGTT	
			* * * * *
48_completa		GTGGGTTGCAAAGATGCTTGGGGTCTTCTCCATAGGGTCAATAAGATAAAGGGACAGT	
A5309		GCAAAATGCACACATATGTAGAGGT-----ATATATGTC-TACAAGGAGACATTGAG	
			* * * * *
48_completa		GGTGTGATGCGCAAGAATGTGTTGGACGTGAATAGCGTAACCAAGCGTTGGGGGAATTAT	
A5309		ATTAAAAGTGTCTAACCAACATGTTAGGAACCAA--GCTTGAG-AACGT-GAACCACTAG	
			* * * * *
48_completa		TGGTCAAGGTCTCGACTTAGTTGGCTCAACACTCGATACTTACTGCCTTCTTGGGCCG	
A5309		TTTCGAGGGCTAGGAACC-----	
			* * * * *
48_completa		ATCCGTGTCTCTCCAGCTTATTAGTGTACCAAAGCTGATGCCAACGGAAAAGGGAAACT	
A5309		-----	
48_completa		TGAAAGGCTACCTTTTGGAAAGGTATCATTACTTCATTGCCAACTTTGGGAGCAGG ...	

FIG 48 e
ama
env
Pro
tica.
ados

positivamente que interagem com os fosfolipídeos da membrana, carregados negativamente.

A seqüência predita de resíduos de aminoácidos do clone A5309-28 apresenta ainda uma região rica em lisina (posições 104 a 223 na ORF), enquanto o clone A5309-48 um domínio transmembrana (posições 79 a 97 na ORF), o que pode corroborar com a inferência de que os clones positivos, bem como a

```

54completa      . . . AACAGCTTGGTAAACACGATAAAGGAGGCAATCGTTGTGTGCAAATACGGAACTGG
A5309           . . . -----

54completa      TTTGACTATCGTAATCATATCTGTATTGTGTTTGGAAACTTGGACCAAGCTTATACGAT
A5309           -----

54completa      TTTCTTCGGAAAACTAATAATATCCCTTCCATTTCCCATTTGGATCTTGTCCGTGGAGAT
A5309           --TATCTCAGACTCTCCAATGAGCCTAGGAAGCTTGGTATTGGAGTAAGAACAAAATAAT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

54completa      TGGCAGACAACTATTGGAATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
A5309           TTGAACTCAA--GTCCAAACGATTCAAATATTTTAGTTCAAGCAAAGAAGGACTAATCTC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

54completa      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTAGTTCACCAGAGTAT--GTCAAAGTTCCCTGACT
A5309           TCCACTCAACTCCCTATAGGGAG--AGCCCGCAGGTGTGTCAAGATTGATTTCCATGACT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

54completa      --ACCAGAGTTCATCTAGAATCACCCAAAGGTTTCCTATTTCAAAGAGAGTTCCCAATCCA
A5309           TTACCTGTGTTGTGCAGTGAACCCCTGGCCATGTACAGCAAATCCGATTTGTGAGACC--
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

54completa      AGTGCTATAAAGGGTTATGATTTTGGCAGCACCACTTAT--GAGCGAGAAGATCAGAATT
A5309           ---ACGATGAAAGCCTGT---TTGAAGGTCTGCTAGTCCATGCTTGAAGCTGAGGAGT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

54completa      ACATTGTATCAACTCGTCATTATAGGGCTCCTGAAGTTATCCTTGGACTTGGCTGGAGCT
A5309           GCATTCTTTC-CTTCTCGCTG-----
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

54completa      ATCCATGTGATATCTGGAGTGTGGGATGTATCTTGGTTGAGTTATGCACGGGCGGAGCTT
A5309           -----

54completa      TGTTCAGACTCACGAAAATTTGGAGCATCTTGCCATGATGGAAGGGTACTTGGTC . . .
A5309           ----- . . .

```

FIGURA 15 - Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do clone A5309-54 e da sonda A5309-295. As seqüências foram alinhadas pelo programa *ClustalW*; as posições de idêntidades estão destacadas em azul.

sonda, apresentam regiões similares, tanto na seqüência predita de aminoácidos, como nas seqüências nucleotídicas, envolvidas com a interação destas proteínas com a membrana plasmática.

Foi feito um RT-PCR com o objetivo de verificar se os clones isolados A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54 continham seqüências que eram expressas em diferentes órgãos da variedade de soja FT-Cristalina. Em todos os órgãos analisados existem seqüências transcritas similares aos clones isolados neste trabalho.

```

170 atggaatcaatcttgacacacctgcgggctctccctatagggag
    M E I N L D T P A G S P Y R E
125 ttgagtgagagattagtccttctttgcttgaactaaaatatttg
    L S G E I S P S L L E L K Y L
80 aatcgtttgacttgagttcaaattattttgttcttactccaata
    N R L D L S S N Y F V L T P I
35 ccaagcttcctaggctcattggagagctctgagata
    P S F L G S L E S L R

```

FIGURA 16 - Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos predita para a sonda A5309-295. A seqüência de nucleotídeos está representada em letras minúsculas enquanto a seqüência predita de aminoácidos em letras maiúsculas. Toda a seqüência representa uma ORF e seu início está destacado com a letra M, em negrito.

MEINLDTPAGSPYRELSGEISP **SLLE** LKYLNRDLSSNYFVLTPISFL **GSLESL**R
1 56

FIGURA 17 - Seqüência de aminoácidos predita para a sonda A5309-295. A ORF predita contém 56 aminoácidos e os sítios de meristoilação (GSLESL) e de fosforilação (SLLE) estão representados em caixa.

O RNA total da raiz, caule, semente e folha, do cultivar FT-Cristalina, estádio V3, foi isolado e amplificado usando-se a técnica de RT-PCR. A etapa de amplificação da segunda fita de cDNA foi feita para o clone A5309-28 com os “primers” 28F e 28 R, para o clone A5309-41 foram usados os “primers” 41 F e 41 R, para o clone A5309-48, os “primers” 48 F e 48 R e para o clone A5309-54, os “primers” 54 F e 54 R (Tabela 1). As amostras de RNA total também foram amplificadas com os “primers” para actina 3 para verificar se havia contaminação com DNA e eliminar artefatos experimentais. A temperatura de pareamento, 50°C, nas reações foi a mesma para todos os clones.

A amplificação com os “primers” específicos para o clone A5309-28 resultou em uma banda de aproximadamente 800 pb em todos os órgãos examinados e o acúmulo de mRNA também parece ser similar. A amplificação do

DNA genômico resultou em uma banda de aproximadamente 950 pb, indicando a provável presença de um íntron (Figura 18).

A amplificação com os “primers” específicos para o clone A5309-41 resultou em três bandas: uma inferior, de aproximadamente 300 pb, uma superior, de aproximadamente 1.300 pb, que foram detectadas em todos os órgãos analisados; e uma terceira intermediária, de aproximadamente 600 pb, que não foi detectada apenas nos transcritos da raiz. Sua detecção pode ter sido comprometida devido à baixa concentração de mRNA isolado deste órgão, uma vez que o produto de amplificação com os “primers” de actina revelou uma banda mais tênue neste órgão.

A amplificação do DNA genômico apresentou um padrão de amplificação polimórfico, o que pode ser explicado pelo fato do clone A5309-41 ser homólogo a uma família multigênica de transportadores que se ligam a ATP (ABC transportadores) (Figura 19).

A amplificação com os “primers” específicos para ao clone A5309-48, homólogo à proteína lipoxigenase, resultou em duas bandas, uma de aproximadamente 1.000 pb, que foi bem tênue em todos os órgãos e não foi detectada nos transcritos da raiz, e uma de aproximadamente 700 pb, que foi detectada em todos os órgãos analisados. Novamente, a detecção da banda de 1.000 pb nos transcritos da raiz pode ter sido comprometida devido a baixa concentração de mRNA isolada deste órgão, uma vez que o produto de amplificação com os “primers” de actina revelou uma banda mais fraca neste órgão.

A amplificação do DNA genômico revelou a presença de duas bandas de tamanhos similares às de mRNA, uma com cerca de 1.000 pb e outra com cerca de 700 pb (Figura 20).

De acordo com suas características e similaridades estruturais as lipoxigenases são divididas em duas classes: tipo 1, que são citoplasmáticas e tipo 2, que apresentam um peptídeo de trânsito que as direcionam para os cloroplastos. As proteínas LOX tipo 1, similares a identificada neste trabalho, são

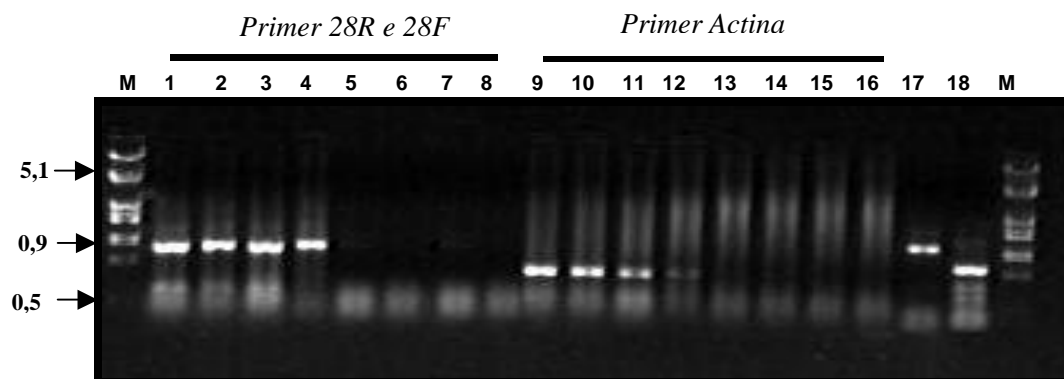


FIGURA 18 - RT-PCR de diferentes órgãos da variedade de soja FT-Cristalina amplificada com os “primers” específicos para o clone A5309-28, homólogo a uma H⁺-ATPase, e com os “primers” específicos para actina, como controle. Os números na parte superior equivalem a diferentes amostras usadas: mRNA de raiz (1 e 9), caule (2 e 10), folha (3 e 11) e de semente (4 e 12); controles negativos de raiz (5 e 13), de caule (6 e 14), de folha (7 e 15) e de semente (8 e 16). Os “primers” usados na amplificação do cDNA estão indicados acima dos números. O DNA genômico também foi amplificado com os “primers” específicos para o clone A5309-28 (17) e com os “primers” de actina (18). M indica marcador de tamanho (DNA de λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III). Os números à esquerda correspondem ao tamanho das bandas em kb.

codificadas por famílias multigênicas e apresentam alta similaridade de seqüência entre todos membros. No entanto, distintas isoformas podem ser identificadas baseando-se em características bioquímicas, como pH ótimo, ponto isoelétrico, massa molecular entre outros (VOROS et al., 1998).

A amplificação com os “primers” específicos para ao clone A5309-54, homólogo a proteína cinase PK12 de tabaco, resultou em duas bandas, uma de aproximadamente 800 pb e outra de 400 pb. Ambas foram detectadas em todos os órgãos analisados. A amplificação do DNA genômico produziu dois fragmentos com cerca de 2.100 pb e de 1.500 pb (Figura 21).

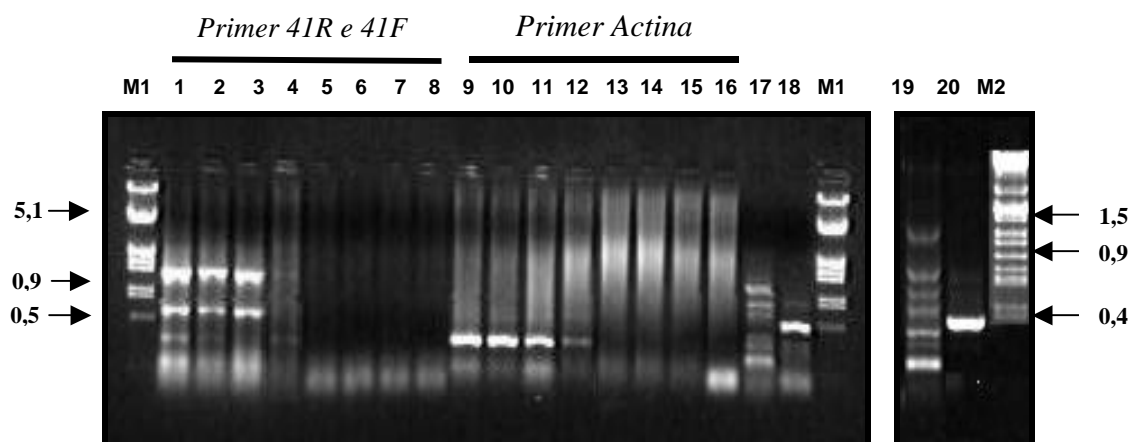


FIGURA 19 - RT-PCR de diferentes órgãos da variedade de soja FT-Cristalina amplificada com os “primers” específicos para o clone A5309-41, homólogo a um transportador ABC, e com os “primers” específicos para actina, como controle. Os números na parte superior equivalem a diferentes amostras usadas: mRNA de raiz (1 e 9), caule (2 e 10), folha (3 e 11) e de semente (4 e 12); controles negativos de raiz (5 e 13), de caule (6 e 14), de folha (7 e 15) e de semente (8 e 16). Os “primers” usados na amplificação do cDNA estão indicados acima dos números. O DNA genômico também foi amplificado com os “primers” específicos para o clone A5309-41 (17 e 19) e com os “primers” de actina (18 e 20). M1 indica marcador de tamanho (DNA de λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III) e M2 (DNA de λ digerido com *Eco* RI, *Hind* III e *Bam* HI). Os números à direita e esquerda correspondem ao tamanho das bandas em kb.

A complexidade da família gênica de PK12 no genoma de tabaco foi estimada por SESSA et al. (1996) por meio de um “Southern blotting” utilizando o fragmento de cDNA de PK12 como sonda. Eles concluíram que PK12 teria apenas uma única cópia no genoma de tabaco, fazendo parte de uma família gênica muito pequena.

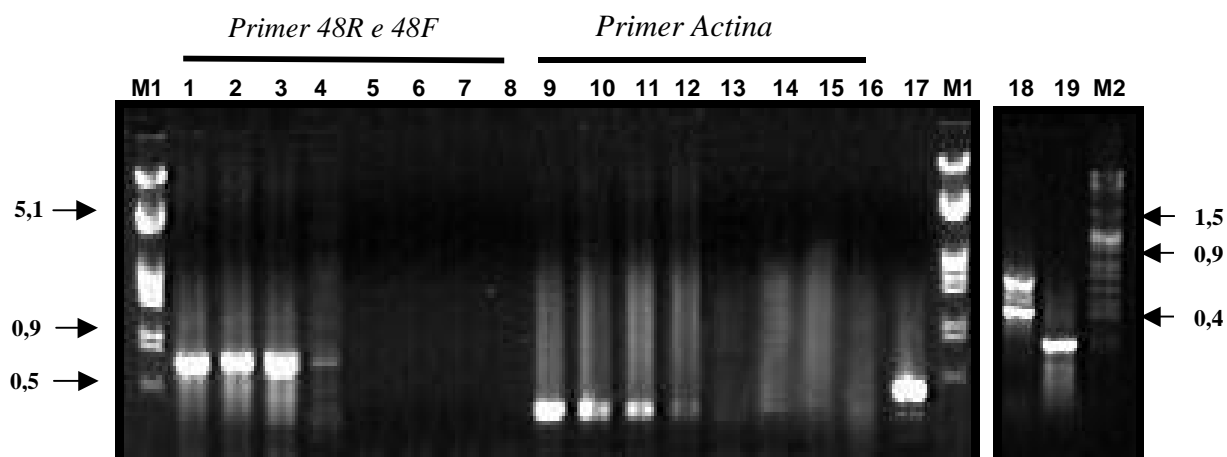


FIGURA 20 - RT-PCR de diferentes órgãos da variedade de soja FT-Cristalina amplificada com os “primers” específicos para o clone A5309-48, homólogo a proteínas lipoxigenases, e com os “primers” específicos para actina, como controle. Os números na parte superior equivalem a diferentes amostras usadas: mRNA de raiz (1 e 9), caule (2 e 10), folha (3 e 11) e de semente (4 e 12); controle negativo de raiz (5 e 13), de caule (6 e 14), de folha (7 e 15) e de semente (8 e 16). Os “primers” usados na amplificação do cDNA estão indicados acima dos números. O DNA genômico também foi amplificado com os “primers” específicos para o clone A5309-48 (18) e com os “primers” de actina (17 e 19). M1 indica marcador de tamanho (DNA de λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III), e M2 (DNA de λ digerido com *Eco* RI, *Hind* III e *Bam* HI). Os números à direita e esquerda correspondem ao tamanho das bandas em kb.

Em nenhum dos RT-PCR foi detectada a presença de DNA genômico contaminando a preparação de RNA total, visto que os controles negativos não apresentaram bandas e o produto de amplificação com os “primers” de actina apresentou o tamanho esperado. Quando na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação, com os “primer” de actina 3, produz um fragmento de 520 pb, já na presença de cDNA observa-se um fragmento de 440 pb devido à remoção de um íntron de 80 pb.

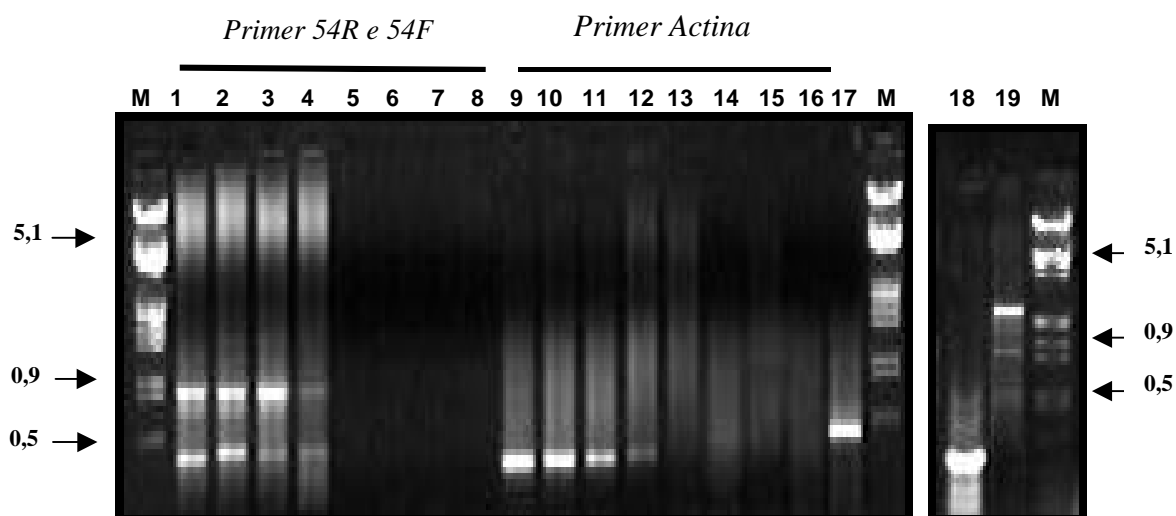


FIGURA 20 - RT-PCR de diferentes órgãos da variedade de soja FT-Cristalina amplificada com os “primers” específicos para o clone A5309-54, homólogo à proteína cinase PK12, e com os “primers” específicos para actina, como controle. Os números na parte superior equivalem a diferentes amostras usadas: mRNA de raiz (1 e 9), caule (2 e 10), folha (3 e 11) e de semente (4 e 12); controle negativo de raiz (5 e 13), de caule (6 e 14), de folha (7 e 15) e de semente (8 e 16). Os “primers” usados na amplificação do cDNA estão indicados acima dos números. O DNA genômico também foi amplificado com os “primers” específicos para o clone A5309-54 (19) e com os “primers” de actina (17 e 18). M indica marcador de tamanho (DNA de λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III). Os números à direita e esquerda correspondem ao tamanho das bandas em kb.

Embora todos os clones isolados possam direta ou indiretamente estar envolvidos na resposta de defesa, nenhum experimento que comprovasse tal inferência foi realizado. Todas as conclusões foram baseadas nas similaridades encontradas entre as seqüências de aminoácido preditas a partir dos clones isolados e aquelas contidas no “GenBank”, uma vez que a homologia encontrada para todos os clones foi alta. É importante observar que os “valores de P” obtidos foram muito pequenos para todas as comparações feitas, indicando que as homologias observadas não são casuais. Estudos funcionais e de caracterização

molecular complementares devem ser realizados futuramente a fim de comprovar o papel destes clones isolados nas repostas de defesa a patógenos em plantas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A compreensão dos mecanismos de resistência a patógenos constitui ferramenta fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fitopatógenos.

Neste trabalho, a busca de seqüências transcritas homólogas a genes envolvidos na resposta de resistência levou ao isolamento de quatro diferentes clones a partir de um “screening” de uma biblioteca de cDNA de folha de soja da variedade FT-Cristalina. Como sonda, foi utilizado um fragmento de 295 pb, homólogo a genes de resistência a doenças. Os clones foram denominados: A5309-28, A5309-41, A5309-48 e A5309-54; e os seus tamanhos variaram entre 1,4 e 2,0 kb.

As seqüências de aminoácidos preditas a partir das sequências primárias dos clones foram comparadas com outras existentes no “GenBank”, em todos os possíveis quadros de leitura. O clone A5309-28 similaridade com uma proteína H⁺-ATPase de *Arabidopsis thaliana*. A proteína codificada por este clone poderia atuar na resposta de resistência por mediar o influxo de prótons através da membrana após a elicitação celular, levando à alcalinização do meio extracelular e acidificação do citosol, ambas necessárias para a efetivação de respostas adicionais envolvidas na defesa.

O clone A5309-41 revelou similaridade com um transportador de membrana da família dos transportadores que se ligam a ATP, conhecida como transportadores ABC (“ATP-Binding Cassette”), quando comparado com seqüências protéicas contidas no “GenBank”. A proteína codificada por este clone poderia atuar na resposta de resistência participando nos mecanismos de detoxificação de produtos oriundos da peroxidação lipídica e do dano oxidativo do DNA devido a AOS formados durante a HR. Esses produtos quando conjugados com uma molécula de glutathione, reação mediada pela proteína glutathione-S-transferase, seriam transportados para o vacúolo ou meio extracelular, detoxificando o citosol. Outra possibilidade é a de que o produto de A5309-41 poderia mediar a liberação de fitoalexinas no citosol imediatamente após a infecção, contribuindo para a contenção do patógeno.

O clone A5309-48 apresentou similaridade com a enzima lipoxigenase (LOX1) e atuaria na resposta de resistência por gerar moléculas sinalizadoras como JA, metil-JA ou peróxidos lipídicos, os quais coordenadamente podem amplificar respostas específicas. A atividade dessa enzima pode ainda causar danos irreversíveis à membrana levando à liberação do conteúdo citoplasmático que pode culminar com a morte da célula vegetal no sítio da infecção. Alternativamente as reações catalisadas por LOX podem resultar na produção de metabólitos secundários tóxicos, voláteis e não voláteis, que podem diretamente inibir a ação do patógeno.

A comparação da seqüência de aminoácidos predita do clone A5309-54 com seqüências contidas no “GenBank” apresentou similaridade com a proteína cinase PK12 de tabaco, induzida por etileno. A fosforilação de proteínas regula inúmeros processos celulares em todos os organismos vivos. A ativação de PK12 por etileno sugere o envolvimento da proteína codificada por este clone nas rotas de transdução de sinal envolvendo etileno, possivelmente coordenando mecanismos gerais de transcrição ou de “splicing”, como sugerido para membros da família LAMMER, à qual pertence a cinase PK 12. A proteína codificada por A5309-54 poderia atuar na fosforilação de proteínas relacionadas com rotas de transdução de sinal induzidas por etileno, como fermentos e elicitação por fatores

de avirulência. O papel de PK12 na resposta a etileno em plantas necessita ser melhor examinado em relação aos outros componentes da rota de sinalização do etileno já identificados.

Todos os quatro clones apresentaram homologia superior a 30% quando comparados com a sonda A5309-295. A maior homologia ocorreu entre a seqüência do clone A5309-54 e a sonda e foi de 53%, justificando o isolamento destes clones da biblioteca de cDNA com o emprego da sonda A5309-295 nas hibridizações.

A seqüência predita de aminoácidos da sonda A5309-295 contém uma ORF de 56 resíduos de aminoácidos e apresenta duas regiões conservadas: um domínio de meristoilação (posições 50 a 55 na ORF), o que indica uma provável localização na membrana, e um sítio de fosforilação por uma proteína cinase caseína II (posições 23 a 26 na ORF). Similarmente todos os clones isolados também apresentam um sítio de fosforilação por uma proteína cinase C e por uma proteína cinase caseína. Com exceção do clone A5309-28, todos os outros clones isolados também apresentam sítio de meristoilação. Este domínio está envolvido em interações entre proteínas e a membrana plasmática, bem como interações proteína:proteína.

O isolamento dos clones positivos poderia também ser justificado pela presença regiões similares nas seqüências predita de aminoácidos dos clones positivos e da sonda, e potencialmente nas seqüências de DNA, que estão envolvidas na interação dessas proteínas com a membrana plasmática. Provavelmente estas regiões devem apresentar aminoácidos carregados positivamente para interagirem com os fosfolípidos da membrana, carregados negativamente.

A seqüência predita de resíduos de aminoácidos do clone A5309-28 apresenta ainda uma região rica em lisina (posições 104 a 223 na ORF), enquanto o clone A5309-48 um domínio transmembrana (posições 79 a 97 na ORF), que podem corroborar com a inferência de que os clones positivos, bem como a sonda, apresentam regiões similares, tanto na seqüência predita de aminoácidos,

como nas seqüências nucleotídicas, envolvidas com a interação destas proteínas com a membrana plasmática.

Amostras de mRNA de raiz, caule, folha e semente foram amplificadas com os “primers” específicos para cada um dos clones isolados a fim de determinar se o padrão de expressão era órgão específico e se os “primers” estavam pareando com mais de um transcrito. Nenhum dos clones apresentou expressão órgão-específico. A amplificação com os “primers” específicos para o clone A5309-28 resultou em uma banda de aproximadamente 800 pb em todos os órgãos examinados. A amplificação do DNA genômico com esses mesmos “primers” resultou em uma banda de aproximadamente 950 pb, indicando a provável presença de um íntron.

Três fragmentos foram amplificados com os “primers” específicos para o clone A5309-41 em todos os órgãos analisados. A amplificação do DNA genômico apresentou um padrão de amplificação polimórfico, o que pode ser explicado pelo fato do clone A5309-41 ser homólogo a uma família multigênica de transportadores ABC.

Os “primers” específicos para os clones A5309-48 e A5309-54 parearam com diferentes transcritos em todos os órgãos analisados, indicando que estas seqüências podem ser homólogas a seqüências gênicas pertencentes a famílias multigênicas.

A importância dos clones de cDNA isolados e caracterizados está na possibilidade destes serem utilizados em trabalhos futuros que venham a caracterizá-los funcionalmente. A utilização destes clones como sondas em bibliotecas genômicas seria importante para a identificação da região reguladora correspondente a cada um dos clones de cDNA isolados. O estudo do padrão de expressão temporal e o induzido por diferentes fatores bióticos e abióticos pode confirmar o envolvimento dos genes, correspondentes às seqüências identificadas, nas repostas de defesa a fitopatógenos. Caso se confirme tal envolvimento, estas seqüências poderão ser ainda utilizadas em programas de melhoramento, com auxílio de técnicas de transformação de plantas, para a criação de variedades tolerantes e/ou resistentes a diversos tipos de patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, N. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease gene define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 10306-10311, 1998.
- ANDERSON, P. A.; LAWRENCE, G. J.; MORRISH, B. C. AYLIFFE, M. A.; FINNEGAN, E. J.; ELLIS, J. G. Inactivation of the the flax rust resistance gene *M* associated with loss of repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. **Plant Cell**, **9**: 641-651, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acid. Res.**, **25**: 3389-3402, 1997.
- ALVAREZ, M. E.; PENNELL, R. I.; MEIJER, P. J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, **92**: 773-784, 1998.
- ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. **Cultura de soja nos cerrados**. Ed. Potafos. Piracicaba, SP. 1993. pp 1-24 e 299-390.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, K. S. **Currents Protocols in Molecular Biology in CD-ROM**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, **276**: 726-733, 1997.
- BARROS, E. G.; RAFALSKI, J. A. Analysis of hypervariable regions in the soybean genome. **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, p. 43, resumo no. E82, Caxambu, MG, Maio de 1998
- BARROS, E. G.; TINGEY, S.; RAFALSKI, J. A. Sequence characterization of hypervariable regions in the soybean genome: leucine-rich repeats and simple sequence repeats. **Genetic and Molecular Biology**, **23**: 411-415, 2000.
- BENDAHMANE, A.; KANYUKA, K.; BAULCOMBE, D. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and death responses. **Plant Cell**, **11**: 781-791, 1999.

- BENT, A.; KUNKEL, B.; DAHLBECK, D. BROW, K.; SCHMIDT, R.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J.; STASKAWICZ, B. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science**, **265**: 1856-1860, 1994.
- BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, **8**: 1757-1771, 1996.
- BENTON, W. D.; DAVIS, R. W. Screening lambda gt recombinants clones by hybridization to single plaques *in situ*. **Science**, **196**: 180-182, 1977.
- BERHANE, K.; WIDERSTEN, M.; ENGSTROM, A.; KOZARICH, J.; MANNERVIK, B. Detoxification of base propenals and other α,β -unsaturated aldehyde products of radical reaction and lipid peroxidation by human glutathione transferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**: 1480-1484, 1994.
- BIEZEN, E. A.; JONES, J. D. G. The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Curr. Biol.**, **8**: R226-R227, 1998.
- BIEZEN, E. A.; SUN, J.; COLEMAN, M. J.; BIBB, M. J.; JONES, J. D. *Arabidopsis* RealA/SpdT homologs implicate (p)pGpp in plant signaling. **Proc Natl. Acad. Sci USA**, **97**: 3747-3752, 2000.
- BOLWELL, G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **2**: 287-294, 1999.
- BOTELLA, M. A.; PARKER, J. E.; FROST, L. N.; BITTNER-EDDY, P. D.; BEYNON, J. L.; DANIELS, M. J.; HOLUB, E. B.; JONES, J. D. G. Three genes of *Arabidopsis* RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Penorospora parasitica* avirulence determinants. **Plant Cell**, **10**: 1847-1860, 1998.
- BOURQUE, S.; PONCHET, M.; BINET, M.; RICCI, P.; PUGIN, A.; LEBRUN-GARCIA, A. Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. **Plant Physiol.**, **118**: 1317-1326, 1998.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**. Ed. Courier Companies, Inc. USA. 2000. pp 1044-1154.
- BUSCHGES, R.; HOLLRICHER, K.; PANSTRUGA, R.; SIMONS, G.; WOLTER, M.; FRIJTERS, A.; van DAELEN, R.; van der LEE, T.; DIERGAARDE, P.; GROENENDIJK, J. The barley MLO gene: a novel control element of plant pathogen resistance. **Cell**, **88**: 695-705, 1997.
- CAI, H.; KLEINE, M.; KIFLE, S.; HARLOFF, H.; SANDAL, N. N.; MARCKER, K. A.; LANKHORST, K.; SALENTIEN, E. M. J.; LANGE, W.; STIEKEMA, W. J.; WYSS, U.; GRUNDLER, F. M. W.; JUNG, C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. **Science**, **275**: 832-835, 1997.

- CAO, H.; BOWLING, S. A.; GORDON, S. DONG, X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell**, **6**: 1583-1592, 1994.
- CAO, H.; LI, X.; DONG, X. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 6531-6536, 1998.
- CENTURY, K. S.; SHAPIRO, A. D.; REPETTI, P. P.; DAHLBECK, D.; HOLUB, E.; STASKAWICZ, B. J. NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. **Science**, **278**: 1963-1965, 1997.
- CHIEN, C. T.; BARTEL, P. L.; STERNGLANZ, R.; FIELDS, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 9578-9582, 1991.
- CLARKE, J. D. Uncoupling PR gene expression from *NPR1* and bacterial resistance: Characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. **Plant Cell**, **10**: 557-569, 1998.
- COLLINS, N. C.; WEBB, C. A.; SEAH, S.; ELLIS, J. G.; HULBERT, S. H.; PRYOR, A. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. **Mol. Plant Micr. Int.**, **11**: 968-978, 1998.
- CROFT, K. P. C.; JUTTNER, F.; SLUSARENKO, A. J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **Plant Physiol.**, **101**: 13-24, 1993.
- DANGL, J. L., DIETRICH, R. A., RICHBERG, M. H. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell**, **8**: 1793-1807, 1996.
- DELANEY, T. P.; FRIEDRICH, L.; RYALS, J. A. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 6602-6606, 1995.
- DEMPSEY, D. A. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, **18**: 547-573, 1999.
- DE WIT, P. J. G. M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the applications of avirulence genes in the control of plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, **30**: 391-418, 1992.
- DIETRICH, R.; RICHBERG, M. H.; SCHMIDT, R. DEAN, C.; DANGL, J. L. A novel zinc finger proteins is encoded by *Arabidopsis LSD1* gene and functions as a negative regulator of plants cell death. **Cell**, **88**: 685-694, 1997.

- DIXON, R. A.; LAMB, C. J.; PAIVA, N. L.; MASOUD, S. Improvement of natural defense responses. **Ann. New York Acad. Sci.**, 126-139, 1996.
- DIXON, M. S. Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 8807-8814, 2000.
- DONG, X. SA, JA, ethylene, and resistance in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **1**: 316-323, 1998.
- DURNER, J.; WENSEHENNE, D.; KESSIG, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 10328-10333, 1998.
- ECKER, J. R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, **268**: 667-675, 1995.
- EIBEN, H. G.; SLUSARENKO, A. J. Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during *Phaseolus vulgaris* (L.) development. **Plant J.**, **5**:123-135, 1994.
- ELLIS, J. G.; DODDS, P. N.; PRYOR, T. The generation of plant disease resistance specificities. **Science**, **5**: 373-379, 2000.
- ELLIS, J. G.; LAWRENCE, G. J.; LUCK, J. E.; DODDS, P. N. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance L that determine differences in gene-for-gene specificity. **Plant Cell**, **11**: 495-506, 1999.
- FALK, A.; FEYS, B. J.; FROST, L. N.; JONES, J. D. G.; DANIELS, M. J.; PARKER, J. E. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eucaryotic lipases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **96**: 3292-3297, 1999.
- FARAZI, T. A. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. **The J. Biol. Chem.**, **276**: 39501-39504, 2001.
- FELIX, G.; GROOKOLF, D. G.; REGENASS, M.; BOLLER, T. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 8831-8834, 1991.
- FEYS, B. J. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **TIG**, **16**: 449-455, 2000.
- FIELDS, S.; STERNGLANZ, R. The two-hybrid system: An assay for protein-protein interactions. **Trends Genet.**, **10**: 286-292, 1991.
- FLOR, H. H. Current status of gene-a-gene concept. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **9**: 275-296, 1971.

- FREIALDENHOVEN, A.; PETERHANSEL, C.; KURTH, J.; KREUZALER, F. Identification of genes required for function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. **Plant Cell**, **8**: 5-14, 1996.
- FRIEDMAN, K. D.; ROSEN, N. L.; NEWMAN, P. J.; MONTGOMERY, R. R. Screening of λ gt11 libraries IN: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols**. San Diego, Academic Press, 1990. 482p.
- GARCIA – MAS, V.; van LEEWEN, H.; MONFORT, A.; de VICENTE, M. C. PUIGDOMENECH, P.; ARUS, P. Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon. **Plant Sci.**, **161**: 165-172, 2001.
- GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E. E.; AUSUBEL, F. M. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. **Genetics**, **143**: 973-982, 1996.
- GLAZEBROOK, J.; ZOOK, M.; MERT, F.; KAGAN, K.; ROGERS, E. E.; CRUTE, I. R.; HOLUB, E. B.; HAMMERSCHMIDT, R.; AUSUBEL, F. M. Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. **Genetics**, **146**: 381-392, 1997.
- GRANT, M.; GODIARD, L.; STRAUBE, E.; ASHFIELD, T.; LEWALD, J.; SATTLER, A.; NNES, R.; DANGL, J. Structure of the *Arabidopsis thaliana* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. **Science**, **269**: 843-846, 1995.
- GREENBERG, J. T.; GUO, A.; KLESSIG, D. F.; AUSUBEL, F. M. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense function. **Cell**, **7**: 551-563, 1994.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; TANG, S.; HARRISON, K.; JONES, J. D. The tomato *cf-9* disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene *Avr9*. **Plant Cell**, **10**: 1252-1266, 1998.
- HIGGINS, D. G., SHARP, P. M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. **CABIOS**, **5**: 151-153, 1992.
- HWANG, C. F.; BHAKTA, A. V.; RUESDELL, G. M.; PUDLO, W. M.; WILLIAMSON, V. M. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. **Plant Cell**, **12**: 1319-1329, 2000.
- JIA, Y.; McADAMS, S. A.; BRYAN, G. T.; HERSHEY, H. P.; VALENTE, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J.**, **19**: 4004-4014, 2000.

- JIRAGE, D.; TOOTLE, T. L.; REUBER, T. L.; FROST, L. N.; FEYS, B. J.; PARKER, J. E.; AUSUBEL, F. M.; GLAZEBROOK, J. *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **96**: 13583-13588, 1999.
- JOHAL, G. S.; BRIGGS, S. P. Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. **Science**, **258**: 985-987, 1992.
- JOHAL, G. S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S. P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Can. J. Bot.**, **1**: 468-474, 1995.
- JONES, D. A.; THOMAS, C. M.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; BALINT-KURTI, P. L.; JONES, J. D. G. Isolation of the tomato Cf9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, **266**: 789-793, 1994.
- JONGEDIJK, E; TIGELAAR, H.; van ROEKEL, J. S. C.; BRES-VLOEMANS, S. A., DEKKER, I.; ELZEN, P. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C., MELCHERS, L. S. Synergistic activity of chitinases β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica**, **85**: 173-180, 1995.
- JOOSTEN, M. H. A. J.; VOGELSANG, R.; COZIJNSEN, T. J.; VERBERNE, M. C.; DE WIT, P. J. G. M. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable Avr-4 elicitors. **Plant Cell**, **9**: 367-379, 1997.
- KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 11746-11750, 1996.
- KANAZIN, V.; BLAKE, T. Cloning and characterization of barley genomic sequences related to know plant disease-resistance genes. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997.
- KEIM, P.; SHOEMAKER, R.C.; PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, **77**: 786-792, 1989.
- KELLER, T.; DMUDE, H. G.; WERNER, D.; DOERNER, P.; DIXON, R. A.; LAMB, C. A plant homolog of neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. **Plant Cell**, **10**: 255-266, 1998.
- KEPPLER, L. D.; NOVACKY, A. Involvement of lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive response. **Phytopathology**, **76**: 104-108, 1986.
- KLEIN, I.; SARKADI, B.; VARADI, A. An inventory of the human ABC proteins et al. **Bioch. Bioph. Acta** **1461**: 237-262, 1999.

- KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **Plant Cell**, **8**: 1.711-1.722, 1996.
- LAGUIDAH, E. S.; ROBERTSON, M. MOULLET, O. Cloning of a barley disease resistance gene analog by homology to the wheat *Cre3* nematode resistance gene. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997a.
- LAGUIDAH, E. S.; SEAH, S.; SIVASITHAMPARAM, S. Isolation and mapping of disease resistance gene sequences from wheat and barley. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997b.
- LAMB, C. J.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, **48**: 251-275, 1997.
- LAUGE, R.; JOSSTEN, M. H.; HAANSTRA, J. P.; GOODWIN, P. H.; DE WIT, P. J. Successful search for resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 9014-9018, 1998.
- LAWRENCE, G.; FINNEGAN, E. J.; AYLIFFE, M., ELLIS, J. The L^6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. **Plant Cell**, **7**: 11995-12006, 1995.
- LEISTER, D. M.; KURTH, J.; YANO, M.; SASAKI, T. L LAURIE, K.; SCHULZE-LEFERT, P. R-genes homologues as candidates for cereal resistance genes. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997.
- LEISTER, D. M.; KURTH, J.; LAURIE, D. A.; YANO, M.; SASAKI, T.; DEVOS, K.; GRANER, A.; SCHULZE-LEFERT, P. Rapid reorganization of resistance genes homologues in cereal genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**:370-375, 1998
- LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardjo, I.; SRINVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf1/caspase9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, **91**: 479-487, 1997.
- LIGTERINK, W.; KROJ, T.; NIEDEN, U.; HIRT, H.; SCHEEL, D. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. **Science**, **276**: 2054-2057, 1997.
- LINO, B.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; VARA, L. E. G. The plasma membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium dependent phosphorylation. **Planta**, **204**: 352-359, 1998.
- LUPAS, A. Coiled coils: new structures and new functions. **Trends Biochem. Sci.**, **21**: 375-382, 1996.
- MAREK, L. F.; BALDWIN, C.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs in a soybean BAC library. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997a.

- MAREK, L. F.; BALDWIN, C.; SHOEMAKER, R. Genetic physical mapping of resistance gene analogs (RGAS) in soybeans. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997b.
- MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E. D.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, **262**: 1432-1436, 1993.
- MARTIN, G. B. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. **Curr. Op. Plant Biol.**, **2**: 273-279, 1999.
- MARTINS, M. F. **Caracterização de sondas hipervariáveis e de uma sequência genômica de soja homóloga a genes de resistência a doenças**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 71p. (Tese D.S.).
- MAYER, M. G.; ZIEGLER, E. An elicitor from *Phytophthora megasperma f. Sp. Glycinea* influences the membrane potential of soybean cotyledonary cells. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, **33**: 397-407, 1988.
- McDOWELL, J. M.; DHANDAYDHAM, M.; LONG, T. A.; AARTS, S. G.; HOLUB, E. B.; DANGL, J. L. Intragenic recombination and diversification selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, **10**: 1861-1874, 1998.
- McDOWELL, J. M.; DANGL, J. L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends Biochem. Sci.**, **25**: 79-82, 2000.
- MEELEY, R. B.; JOAHAL, G. S.; BRIGGS, S. P.; WALTON, J. D. A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. **Plant Cell**, **4**: 71-77, 1992.
- MELCHERS, L. S.; STUIVER, M. H. Novel genes for disease-resistance breeding. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **3**: 147-152, 2000.
- MEYER, M.; SCHRECK, R.; BAEUERLE, P. A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-KB and AP-1 in intact cells: as secondary antioxidant-responsive factor. **EMBO J.**, **12**: 2005-2015, 1993.
- MEYERS, B. C.; SHEN, K. A.; ROHANI, P.; GAUT, B. S.; MICHELMORE, R. W. Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. **Plant Cell**, **10**: 1833-1846, 1998.
- MICHELMORE, R. W. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Ann. Rev. Phytopathol.**, **33**: 393-427, 1995.
- MINDRINOS, M.; KATAGIRI, F.; YU, G. L.; AUSUBEL, F. The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein contain a nucleotide-binding site and leucine rich repeats. **Cell**, **78**: 1089-1099, 1994.

- OLDROYD, G. E. D.; STASKAWICZ, B. J. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 10300-10305, 1998.
- ORI, N.; ESHED, Y.; PARAN, I.; PRESTING, G.; AVIV, D.; TANKSLEY, S.; ZAMIR, D.; FLUHR, R. The *IC2* Family from the wilt resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **Plant Cell**, **9**: 521-532, 1997.
- OUSBOURN, A. E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **Plant Cell**, **8**: 1821-1831, 1996.
- PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **J. Mol. Evol.**, **50**: 203-213, 2000.
- PARKER, J. E.; COLEMAN, M. J.; SZABO, V.; FROST, L. N.; SCHMIDT, R.; van der BIEZEN, E. A.; MOORES, T.; DEAN, C.; DANIELS, J. G. G. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. **Plant Cell**, **9**: 879-894, 1997.
- PIETERSE, C. M. J. A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, **10**: 1571-1580, 1998.
- PIFFANELLI, P.; DEVOTO, A.; SCHULZE-LEFERT, P. Defense signaling in cereals. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **2**: 295-300, 1999.
- RAFALSKI, A. J.; TINGEY, S.V. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N=40. **IN S.J. O'BRIEN (ed.) Genetic Maps**. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993, pp. 6149-6156.
- RAZ, V.; FLUHR, R. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. **Plant Cell**, **5**: 523-539, 1993.
- REA, P. A. MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. **J. Exp. Bot.**, **10**: 895-913, 1998.
- REUBER, T. L.; PLOTNIKOVA, J. M.; DEWDNEY, J.; ROGERS, E. E.; WOOD, W.; AUSUBEL, F. M. Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. **Plant J.**, **16**: 473-485, 1997.
- RIVIKIN, M. I.; BOROVKOVA, I. G.; BOROVKOV, A. Y.; STEFFENSON, B. J.; McCLEAN, P. E. Analysis and mapping of the resistance-related sequence in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997.

- ROMEIS, T.; PIEDRAS, P.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. **Plant Cell**, **12**: 803-815, 2000.
- SALMERON, J. M.; OLDROY, G. E. D.; ROMMENS, C. M. T.; SCHOFIELD, S. R.; KIM, H. S.; LAVELLE, D. T.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, F. J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance gene and lies embedded with the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, **86**: 123-133, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- SANCHEZ-FERNANDEZ, R.; ARDILES-DIAZ, W.; VON MONTAGU, M.; INZÉ, D. Cloning and expression analyses of *AtMRP4*, a novel *MRP-like* gene from *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.**, **258**: 82-84, 1998.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **74**: 5463-5467, 1977.
- SCHEEL, D. Resistance response physiology and signal transduction. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **1**: 305-310, 1998.
- SESSA, G.; RAZ, V.; SAVALDI, S.; FLUHR, R. PK12, a plant dual-specificity protein kinase of the LAMMER family, is regulated by the hormone ethylene. **Plant Cell**, **8**: 2223-2234, 1996.
- SHAH, J.; KACHROO, P.; KLESSIG, D. F. The *Arabidopsis ss1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. **Plant Cell**, **11**: 191-206, 1999.
- SHEAN, K. A.; MEYERS, B. C.; CHIN, D.; KIM, S.; MAZIER, M.; Identification of numerous resistance-like genes in lettuce using PCR with degenerate oligonucleotide primers. **Abstracts of Plant & Animals Genome V**, 1997.
- SLUSARENKO, A. J.; MEIER, B. M.; CROFT, K. P. C.; EIBEN, H. G. Lipoxygenase in plant disease. In: **Mechanisms of Plant Defense Responses**. FRITIG, B.; GEGRAND, M. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 211-220, 1993.
- SONG, W. Y.; WANG, G. L.; CHEN, L. L.; KIM, H. S.; PI, L. Y.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science**, **270**: 1804-1806, 1995.
- SPIELMEYER, W.; ROBERTSON, M.; COLLINS, N.; LEITER, D.; SCHULZELEFERT, P.; SEAH, S.; MOULLET, O.; LAGUDAH, E. S. A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, **41**: 782-788, 1998.

- STASKAWICZ, B. J.; AUSEBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, **268**: 661-667, 1995.
- STEFFENS, M.; Ettl, F.; KRANZ, D.; KINDL, H. Vanadate mimics effects of fungal cell wall in eliciting gene activation in plant cell cultures. **Planta**, **177**: 160-168, 1989.
- SWIDERSKI, M. R.; INNES, R. W. The *Arabidopsis* *PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. **Plant J.**, **26**: 101-112, 2001.
- TANG, X.; FREDERICK, R. D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D. A.; JIA, Y.; MARTIN, G. B. Initiation of plant disease by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. **Science**, **274**: 2060-2063, 1996.
- TANG, X.; XIE, M.; KIM, Y. J.; ZHOU, J.; KLESSIG, D. F.; MARTIN, G. B. Overexpression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance. **Plant Cell**, **11**: 15-30, 1999.
- THOMAS, C. M.; JONES, D. A.; PARNISKE, M.; HARRISON, K.; KURTI, P. J.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, J. D. Characterization of tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. **Plant Cell**, **9**: 2209-2224,
- THOMPSON, J. D.; D. G. HIGGINS, T. J.; GIBSON. *ClustalW*: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** **22**: 4673-4680, 1994.
- TORRES, M. A.; ONOUCHI, H.; HAMADA, ACHIDA, C.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of human respiratory burst oxidative (gp91^{phox}). **Plant J.**, **14**: 365-370, 1998.
- VOROS, K.; FEUSSNER, I.; KUHN, H.; LEE, J.; GRANER, A.; LOBLER, M.; PARTHIER, B.; WASTERNAK, C. Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *Eur. J. Biochem.* **251**: 36-44, 1998.
- VOS, P.; SIMONS, G.; JESSE, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.; HORGES, R.; FRIJTERS, A.; GROENENDIJK, J.; DIERGAARDE, P.; REIJANS, M.; ONSTENK, J.; BOTH, M.; PELEMAN, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J.; ZABEAU, M. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotech.**, **16**: 1365-1369, 1998.
- XIAO, S.; ELWOOD, S.; CALIS, O.; PATRICK, E.; LI, T.; COLEMAN, M.; TURNER, J. B. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. **Science**, **291**: 118-120, 2001.

- YANG, S. F.; HOTTMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, **35**: 155-189, 1984.
- YORINORI, J. T. Metodologia de produção de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis*. **Fitopatol. Bras.**, **16** (2): 58-60, 1991.
- WANG, G. L.; RUAN, L.; SONG, W. Y.; SIDERIS, S.; CHE, L.; PI, L.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.; FAUQUET, C.; GAUT, B. S.; WHALEN, M. C.; RONALD, P. C. Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. **Plant Cell**, **10**: 765-779, 1998.
- WADSWORTH, G. J.; REDINHBAUGH, M. G.; SCANDALIOS, J. G. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. **Analyt. Biochem.**, **172**: 277-283, 1988.
- WITHAM, S., DINESH-KUMAR, S. P.; CHOI, D.; HEHL, R.; CORR, C.; BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and interleucin-1 receptor. **Cell**, **78**: 1101-1115, 1994.
- WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Curr. Opin. Plant Biol.**, **3**: 291-298, 2000.
- WU, G.; SHORTT, B. J.; LAWRENCE, E. B.; LEVINE, E. B.; FITZSIMMONS, C.; SHAH, D. M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂ generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **Plant Cell**, **7**: 1357-1368, 1995.
- ZHOU, F.; KURTH, J.; WEI, F.; ELLIOTT, C.; VALE, G.; YAHIAOUL, N.; KELLER, B.; SOMERVILLE, S.; WISE, R.; SCHULZE, P. L. Cell-autonomous expression of barley *Mla* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via *rar1*-independent signaling pathway. **Plant Cell**, **13**: 337-350, 2001.
- ZHOU, J.; LOH, Y. T., BRESSAN, R. A., MARTIN, G. B. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in hypersensitive response. **Cell**, **83**: 1-20, 1995.