

SÔNIA REGINA NOGUEIRA

**RESISTÊNCIA DE PLANTAS HOSPEDEIRAS E IDENTIFICAÇÃO DE
GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO SOJA -
*Phakopsora pachyrhizi***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

SÔNIA REGINA NOGUEIRA

**RESISTÊNCIA DE PLANTAS HOSPEDEIRAS E IDENTIFICAÇÃO DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO SOJA - *Phakopsora
pachyrhizi***

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

APROVADA: 09 de agosto de 2007.

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Co-orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Pesq. Klaus Konrad Scheuermann

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

Aos meus pais João e Maria

DEDICO

À Deus pela onipotência e onipresença

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao governo do estado do Tocantins junto a Fundação Universidade do Tocantins (UNITINS) e a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAGRO) pela liberação durante o curso de doutorado.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel pela oportunidade e orientação na execução deste trabalho.

Aos professores Maffia e Eduardo pela amizade, aconselhamentos e ajuda sempre disponíveis.

Aos professores Eduardo S. G. Mizubuti e Fabrício Á. Rodrigues pelos aconselhamentos e por compor minha banca examinadora.

Ao Dra. Eveline Teixeira Caixeta por compor a banca examinadora e sugestões.

Aos meus pais João e Maria pelo amor, apoio e incentivo incondicionais, que me fizeram não desistir dessa conquista.

A minha família, Cezar, Ivonete, Laís e Lucas pelo amor e horas de alegria.

Ao meu namorado Cassio pelo reencontro, pelo amor e por tudo que estamos vivendo.

As minhas irmãs, Luciana Tavares, Fernanda Rausch e Leonarda Neves pela amizade, força, dedicação, aprendizado e carinho incontáveis.

Ao meu amigo e “orientador” de laboratório Klaus Scheuermann, pelos ensinamentos, paciência e amizade e é claro por compor a banca examinadora e sugestões.

A minha “subordinada” e querida amiga Michelle Bayerl pela amizade, carinho, cuidados e ajuda em qualquer momento, pra tudo.

Ao meu amigo Luís Carlos, pelos milhões de vasos cheios, ajuda nos experimentos e pela força.

A minha amiga Janaína pela divisão dos momentos complicados e amizade

A minha família do laboratório de genômica, Miki, Klaus, Janaína, Fernanda, Michelle, Gustavo, Cynthia, Tadeu, Luís, Thaís, Leo, Lúcio, Jamile, Brunão, Bruninho, Ricardo e Murilo pela amizade, convivência, cumplicidade e horas de risos.

Aos amigos Luis Pessoni, Maurinho e Leandro pela amizade e ajuda.

A todos que contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	
RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE <i>VIGNA UNGUICULATA</i> , <i>CAJANUS CAJAN</i> E <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> AO ISOLADO MONOPUSTULAR PPUFV01 DE <i>PHAKOPSORA PACHYRHIZI</i>	8
RESUMO	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Obtenção e caracterização do isolado monopustular.....	15
2.2. Material vegetal, cultivo das plantas e inoculação.	16
2.3. Avaliação da resistência ao isolado monopustular PPUFV01 de <i>P. pachyrhizi</i>	16
3. RESULTADOS	24
3.1. Caracterização do isolado PPUFV01 de <i>P. pachyrhizi</i>	24
3.2. Reação dos genótipos de feijão-caupi ao isolado PPUFV01 de <i>P. pachyrhizi</i>	25
3.3. Reação dos genótipos de guandu ao isolado PPUFV01 de <i>P. pachyrhizi</i>	30
3.4. Reação dos genótipos de feijão-comum ao isolado PPUFV01 de <i>P. pachyrhizi</i> . ..	35

4. DISCUSSÃO.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO SOJA UFVS 2002 - <i>PHAKOPSORA PACHYRHIZI</i>	47
RESUMO	47
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1. Cultivo das plantas e inoculação.....	54
2.2. Construções das bibliotecas subtrativas.....	54
2.3. Seqüenciamento e análise das bibliotecas.	56
2.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	57
3. RESULTADOS	61
3.1. Construções das bibliotecas subtrativas.....	61
3.2. Análise da biblioteca enriquecida para genes diferencialmente expressos aos dois dias após a inoculação e classificação dos ESTs.....	62
3.3. Análise da biblioteca subtrativa enriquecida para genes diferencialmente expressos aos 9 dias após a inoculação e classificação dos ESTs.....	67
3.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	76
4. DISCUSSÃO.....	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
6. ANEXOS.....	95

RESUMO

NOGUEIRA, Sônia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genes diferencialmente expressos na interação soja - *Phakopsora pachyrhizi*.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Fabrício de Ávila Rodrigues

A produção brasileira de soja corresponde a 25% da safra mundial. Entre os problemas fitossanitários, a ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* é considerada a doença de maior importância, em todas as áreas de cultivo no mundo. Todavia, são escassos estudos relativos à biologia do fungo e sua gama de hospedeiros. Assim, este trabalho teve por objetivo identificar genes da soja diferencialmente expressos na interação soja UFVS 2002 – *P. pachyrhizi*, e avaliar 55 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), 55 genótipos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e 13 de feijão-comum (*P. vulgaris* L.) quanto à resistência ao isolado monopustular PPUFV01. Duas bibliotecas subtrativas enriquecidas para genes diferencialmente expressos em soja em resposta à *P. pachyrhizi*, aos 2 e 9 dias após a inoculação, foram construídas. Foram identificados ESTs com similaridade a genes de resposta de defesa, genes de resposta a estresses, genes relacionados ao metabolismo basal e genes com função desconhecida. A análise da expressão diferencial por RT-qPCR de 25 genes selecionados, mostrou que 14 foram induzidos em resposta à infecção pelo patógeno, entre estes os genes que codificam para as proteínas PR4, thioredoxina, quitinase 1, R14, calmodulina, catalase, hemeoxigenase e RD22; estudos funcionais deverão ser efetuados para confirmar o papel de cada um desses genes na

interação. Quanto à análise da resistência de hospedeiros foram identificadas 5 tipos de reação nos genótipos avaliados, sendo observadas reação de imunidade e suscetibilidade, com a formação de urédias esporulantes, similar ao que ocorre em soja. De modo geral todos, os genótipos de caupi foram resistentes, não sendo identificado nenhum genótipo com lesão tipo TAN, indicativa de susceptibilidade. Em guandu foram identificados de genótipos imunes a genótipos completamente suscetíveis, com nível de esporulação semelhante ao observado em soja. Nenhum genótipo de feijão-comum apresentou reação de imunidade, sendo identificados genótipos resistentes e suscetíveis, com esporulação menor do que a observada em soja. O feijão-comum e o guandu podem constituir importantes reservatórios para manutenção do fungo no campo na ausência de plantas de soja como também constituem importantes fontes de resistência a *P. pachyrhizi*.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Sônia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Host resistance and identification of genes differentially expressed in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Fabrício de Ávila Rodrigues

The Brazilian soybean production accounts for 25% of the world production. The soybean asian rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* is one of the most important fungal disease of this crop. However, there are few studies available related to the biology of the fungus and its host range. Thus, this work aimed to identify soybean genes differentially expressed in the soybean-UFVS 2002 – *P. pachyrhizi* interaction, and to evaluate the resistance of 55 genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), 55 of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and 13 of the common bean (*P. vulgaris* L.) to the isolate PPUFV01. Two subtractive libraries enriched for genes differentially expressed in soybean in response to *P. pachyrhizi*, at 2 and 9 days after inoculation, were built. ESTs were identified with similarity to defense response genes, stress response genes, basal metabolism-related genes and genes with unknown function. Analysis of differential expression by RT-qPCR of 25 genes selected showed that 14 were induced in response to infection by the pathogen, including genes that codes for proteins PR4, thioredoxin, quitinase 1, R14, calmodulin, catalase, hemeoxygenase and RD22; functional studies must be carried out to confirm and quantify the function of these genes in the interaction. Host resistance analyses identified 5 types of reaction in the genotypes evaluated, ranging from immunity to susceptibility reactions similar to what occurs in soybean. In

general, all the cowpea genotypes were resistant, and it was not observed genotype with TAN type lesion, indicative of susceptibility. In pigeon pea, genotypes ranging from immune to completely susceptible were identified; the susceptible genotypes had sporulating level similar to what is observed in soybean. No common bean genotype presented immunity reaction, with resistant and susceptible genotypes being identified, although with lower than susceptible soybean. Common bean and pigeon pea can be important reservoirs for fungus maintenance in the field in the absence of soybean plants as well as important alternative sources of resistance genes to *P. pachyrhizi*.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é originária da Ásia, aonde é cultivada há centenas de anos. Atualmente, é plantada em todo o mundo. No Brasil, a cultura ocupa lugar de destaque e a produção nacional corresponde a 25% da safra mundial. Entretanto, a expectativa de expansão da área de cultivo e aumento nos rendimentos é limitada por diversos fatores, entre eles os problemas de ordem fitossanitária que acarretam em perdas de produção. As perdas pela ocorrência da ferrugem asiática, são consideradas como a de maior importância para a cultura da soja no mundo.

Nos últimos anos, a ferrugem da soja disseminou-se rapidamente por ampla área de exploração desta cultura na América do Sul. Prejuízos decorrentes da doença comprometam a rentabilidade dos produtores e a economia dos países onde a soja possui destaque no agronegócio, como é o caso do Brasil, segundo maior produtor mundial de soja (Yorinori & Lazzarotto, 2004; Yorinori et al., 2005). Até o momento, o controle da doença é feito basicamente com a aplicação de fungicidas.

Na última safra (2006/07), o “Sistema Alerta” implantado pela Embrapa Soja constatou o registro de 1.353 casos de ferrugem asiática em 13 estados. Paraná, Mato Grosso do Sul e Bahia foram os de maior ocorrência, com 616, 394 e 128 casos, respectivamente. As perdas, em grãos, provocadas pela ferrugem asiática da soja somaram aproximadamente 4,5% da safra brasileira de soja em 2006/07, o que equivale a 2,67 milhões de toneladas de grãos ou U\$ 615,7 milhões, com um o preço médio de U\$ 230,6 a tonelada de soja. Com o custo da operação de controle, cuja média nacional ficou em 2,3 aplicações por hectare, o que representa US\$ 1,58 bilhão, o custo total da ferrugem asiática na safra 2006/07 foi de U\$ 2,19 bilhões (Guirra, 2007; Pessoa, 2007).

A ferrugem da soja é causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora* sp. que pertence ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae. Duas espécies do gênero *Phakopsora*, são conhecidas como agentes causais dessa doença, *P. meibomiae* Arthur & Arthur e *P. pachyrhizi* Sydow & P. Sydow, amplamente distribuídas nas regiões de cultivo. As características morfológicas das duas espécies de *Phakopsora* muitas vezes não permitem sua diferenciação, a qual somente é feita por meio de análises moleculares. A determinação da seqüência de nucleotídeo da região ITS revelou mais de 99% de similaridade entre os isolados de *P. pachyrhizi* ou de *P. meibomiae*, no entanto, observou-se 80% de similaridade de seqüência entre as duas espécies (Frederick et al, 2002).

A espécie *P. meibomiae* é nativa do continente americano e ocorre desde Porto Rico até o sul do Brasil e causa a doença conhecida como ferrugem americana. Esta raramente causa perdas e ocorre em condições de temperaturas amenas e umidade relativa elevada. A espécie *P. meibomiae* infecta naturalmente 60 espécies em 31 gêneros diferentes. A ferrugem asiática, causada por *P. pachyrhizi*, é mais agressiva e pode provocar perdas que variam de 70 a 80% da produção. O patógeno infecta mais de 90 espécies em pelo menos 43 gêneros. Vinte e quatro espécies pertencentes a 19 gêneros são hospedeiras das duas espécies do fungo (Frederick et al., 2002).

A ferrugem asiática é considerada uma doença policíclica e sua importância aumentou principalmente por rápida disseminação do patógeno e pela falta de cultivares resistentes (Hartman, 2005). A obtenção de cultivar de soja resistente à ferrugem asiática é um desafio para a pesquisa. Segundo Bromfield (1981) e Hartwig (1986), quatro genes dominantes para resistência foram identificados (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*). No entanto, já existem relatos de raças capazes de suplantá-los, indicando que a utilização de resistência monogênica para o controle da ferrugem da soja tem importância limitada. Uma alternativa para programas de melhoramento genético é o uso de cultivares que apresentem resistência parcial e tolerância. Genótipos com níveis diferenciados de severidade como maior período latente e menor capacidade de esporulação do patógeno, podem resultar em redução de amarelecimento e desfolha. Genótipos com essas características, denominados *slow rusting*, têm grande valor no manejo da doença no campo, podendo reduzir o número de

aplicação de fungicidas durante a estação de cultivo, uma vez que ésta é a principal prática de controle da ferrugem da soja (Hartman et al., 2005).

Genótipos de soja diferem na sua reação a *Phakopsora sp.* e o tipo da resistência também é variável. McLean (1979) caracterizou três tipos de infecção em soja. Na infecção tipo 1, não são observados sintomas da doença, e a resposta é de imunidade. A reação tipo 2, caracterizada como intermediária, é considerada reação de resistência e consiste de lesões necróticas com até 2 urédias/lesão ou sem formação de urédias. Na infecção tipo 3, ocorre esporulação abundante, com necrose dos tecidos circundando as urédias, sendo assim considerada uma reação suscetível. Bromfield & Hartwig (1980) denominaram estas reações como imune, RB (“Reddish Brown”) e TAN, respectivamente. Essas reações também foram relatadas por Hartman et al. (1992) e Hartman (2005). Geralmente, *P. meibomiae* causa lesões RB em seus hospedeiros, enquanto *P. pachyrhizi* causa lesões TAN.

A ferrugem da soja é responsável por perdas significantes na África, Ásia, Austrália e América do Sul. Até o momento, nenhuma cultivar comercial de soja é resistente a todos os isolados do patógeno e ainda muito pouco é conhecido sobre mecanismos moleculares envolvidos na interação entre o patógeno e seus hospedeiros. Novas estratégias devem ser adotadas para o controle da ferrugem e para isto é fundamental aumentar o entendimento da biologia do patógeno e do processo de infecção.

Tendo em vista a natureza biotrófica de *P. pachyrhizi*, a gama de hospedeiros tem grande importância na epidemiologia desse patógeno. As plantas da família Fabaceae, muitas vezes nativas nas regiões de cultivo de soja, podem ter importante papel na manutenção do patógeno na ausência da soja, funcionando como “ponte verde” para a manutenção do fungo no campo. Vários são os relatos na literatura de ocorrência de ferrugem causada por *P. pachyrhizi* em leguminosas, muitas vezes sendo identificados na entressafra da cultura da soja.

Plantas de Kudzu (*Pueraria lobata*) foram confirmadas como potenciais hospedeiros alternativos durante o inverno no sul dos Estados Unidos (Perez-Hernandez et al., 2005). Nesse mesmo estudo foram investigados no México, América Central e Caribe a presença de *P. pachyrhizi* em *Pueraria lobata*, *Pachyrhizus erosus*, *Vigna unguiculata*, *Cajanus cajan* e *Lablab purpureus*. A

importância desses hospedeiros no estabelecimento do patógeno e dispersão dos uredósporos no continente americano é relevante (Perez-Hernandez et al., 2005).

Na Argentina foi feito um estudo com plantas da família Fabaceae, sendo que a espécie *Pueraria lobata*, além de soja, foi identificada como hospedeira naturalmente infectada por *P. pachyrhizi* (Formento et al., 2005). Em 2006 foi feito o primeiro relato de *P. pachyrhizi* em plantas de *Phaseolus coccineus*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* nos Estados Unidos (Lynch et al., 2006). Um grupo de 20 cultivares de *P. vulgaris* foram avaliados para resistência a seis isolados de *P. pachyrhizi* e foram identificadas respostas diferenciadas entre as cultivares e interação cultivar-isolado (Miles et al., 2007).

A espécie *P. pachyrhizi* foi descrita primeiramente no Japão em 1902. Por volta de 1914, a ferrugem asiática ocorreu, em caráter epidêmico, em vários países no sudoeste da Ásia. Na Coreia a doença foi identificada em 1935 (Chung e Park, 1977). Segundo Kochman (1977), *P. pachyrhizi* foi primeiramente detectada na Austrália em *Glycine clandestina* em 1954 e depois disso foi relatada em áreas de plantio de soja. Em 1970, *P. pachyrhizi* foi relatada em Zâmbia e, em 1980, em Togo, se disseminando então para vários países da África. Em 1998, a ferrugem asiática foi constatada em Uganda, Quênia e Ruanda (Miles et al., 2003). Em março de 2001 foi detectada na África do Sul, onde atingiu caráter epidêmico em 2002. Nas Américas, o patógeno foi encontrado no Hawaii em 1994 (Killgore et al., 1994). Na safra de 2001/2002 foi identificada no Paraguai.

A ocorrência de *P. pachyrhizi* no Brasil foi relatada pela primeira vez no final da safra de 2001/2002, logo após o relato de ocorrência no Paraguai, o que representou uma grande ameaça para os países do continente americano (Yorinori et al., 2002). Desde então o fungo se dispersou pela América do Sul, sendo relatado na Bolívia em 2003 e na Argentina, Uruguai e Colômbia em 2004. Em 2004, foi também constatado nos Estados Unidos (Schneider et al., 2005). Os relatos de ocorrência são feitos em plantas de soja e também em outras espécies. Durante o mês de abril de 2004, áreas contendo feijão-comum próximas a locais com plantios de soja infectados com a ferrugem, também foram infectadas por *P. pachyrhizi* na África do Sul (DuPreez et al., 2005).

Nos Estados Unidos foram feitos relatos da ocorrência de télias de *P. pachyrhizi* em kudzu (*P. lobata*) em 2005 na Flórida e em 2006 no Texas e na Carolina do Norte. A diagnose foi baseada em observações visuais, seguida de análise por PCR (Harmon, 2005; Isakeit, 2006 e Koenning et al., 2006). No final de 2005, plantas de *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. lunatus* apresentando lesões típicas da infecção causada por *Phakopsora* foram encontradas nos Estados Unidos. Os resultados de PCR confirmaram que era *P. pachyrhizi* o agente causal da doença nessas plantas (Lynch et al., 2006). Morel (2006) publicou o primeiro relato de *P. pachyrhizi* em soja perene (*Neonotonia wightii* Wight & Arn.) no Paraguai.

Em *P. pachyrhizi* observam-se três tipos de esporos. Uredósporos são os esporos mais comuns e encontrados nos campos de cultivos de soja e também em hospedeiros alternativos. São produzidos em grandes quantidades em vários ciclos durante o ciclo da cultura e são dispersos facilmente pelo vento. Télias e teliósporos são observados no final do ciclo da cultura sob condições de temperaturas amenas e também em estudos de casa-de-vegetação. A germinação dos teliósporos e subsequente formação de basidiósporos somente foram observadas sob condições de laboratório por Saksirirat & Hoppe (1991), dessa maneira, a caracterização do ciclo de vida do fungo ainda não foi claramente estabelecida. O processo de infecção empregado por *P. pachyrhizi* envolve a deposição do urediniósporo na superfície do hospedeiro, germinação e formação do apressório. A partir daí ocorre à penetração no tecido vegetal diretamente através da cutícula, em seguida, o crescimento intercelular e a formação dos haustórios. Após 8 dias é possível visualizar as urédias, principalmente na face abaxial das folhas e finalmente a liberação dos uredósporos.

A complexidade estrutural e funcional das interações planta-patógenos biotróficos e o iminente papel de ambos nos ecossistemas naturais e na agricultura, têm fascinado pesquisadores por mais de um século. Interações são ditas incompatíveis quando o sistema de defesa da planta é prontamente ativado, levando a resistência. Quando este sistema é ativado tardiamente ou não ativado, a resposta é de suscetibilidade e a interação é dita compatível, tendo em vista o estabelecimento do patógeno (Ouchi, 2006).

Embora a interação biotrófica entre alguns fungos e seus hospedeiros dure apenas 1 ou 2 dias para oídios e ferrugens, a interação compatível entre a célula hospedeira e o patógeno pode durar algumas semanas, como é o caso da ferrugem da soja, e está usualmente associada com mudanças dos padrões de expressão de genes no hospedeiro e no patógeno, o que permite ao fungo adquirir nutrientes de forma eficiente, sem matar a célula vegetal rapidamente (Heath, 2002).

Em interações incompatíveis as respostas de defesa no hospedeiro são prontamente ativadas e previnem o desenvolvimento do patógeno. Uma reação de defesa comumente verificada em interações incompatíveis é a resposta de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela morte celular no sítio de infecção, o que impede a disseminação do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Entender os mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento, transdução de sinais e ativação das respostas de defesa nas interações incompatíveis, bem como de fatores envolvidos no estabelecimento da interação compatível pode fornecer subsídios para novas estratégias de controle de doenças de plantas, principalmente para o patossistema soja - *P. pachyrhizi*, onde ainda não estão disponíveis cultivares resistentes.

Estudos com o objetivo de se conhecer processos bioquímicos e moleculares, essenciais ao desenvolvimento de novos métodos de manejo da doença, como o seqüenciamento genômico de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* e da interação entre o fungo e o hospedeiro estão sendo realizados. Seqüências completas do genoma mitocondrial e também etiquetas de seqüências expressas (ESTs) derivadas de bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNA isolado de uredósporos, uredósporos germinados, folhas inoculadas 6-8 dias após inoculação (d.a.i) e folhas inoculadas 13-15 d.a.i, apresentando intensa esporulação (Posada-Buitrago & Frederick, 2005; Posada-Buitrago et al, 2006). A comparação das seqüências do genoma de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* poderá identificar diferenças responsáveis pela variação na virulência desses organismos. Os genomas de *P. pachyrhizi* e *P. meibomiae* são estimados em 50 Mb cada um (Posada-Buitrago & Frederick, 2005; Posada-Buitrago et al, 2006).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: i - identificar genes diferencialmente expressos nessa interação, por meio da utilização da

técnica de hibridização subtrativa por supressão (Capítulo 1); e ii - avaliar a reação de genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e feijão-comum (*P. vulgaris* L) quanto à resistência a um isolado monopustular de *P. pachyrhizi* (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE *VIGNA UNGUICULATA*, *CAJANUS CAJAN* E *PHASEOLUS VULGARIS* AO ISOLADO MONOPUSTULAR PPUFV01 DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*.

RESUMO

NOGUEIRA, Sônia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Resistência de genótipos de *Vigna unguiculata*, *Cajanus cajan* e *Phaseolus vulgaris* ao isolado monopustular UFVPP01 de *Phakopsora pachyrhizi*.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Fabrício de Ávila Rodrigues.

O fungo *P. pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem da soja, tem ampla gama de hospedeiros, os quais podem servir como fonte de inóculo para epidemias de ferrugem asiática em soja. Todavia, ainda não foi efetuada uma análise detalhada da reação de diferentes genótipos destes hospedeiros ao patógeno. Assim, neste trabalho avaliou-se a reação de 55 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), 55 de guandu (*Cajanus cajan*) e 13 de feijão-comum (*P. vulgaris*) quanto à resistência ao isolado monopustular UFVPP01 de *P. pachyrhizi*. Foram identificados 5 tipos de reação dos genótipos a *P. pachyrhizi*, sendo observadas reações de imunidade a suscetibilidade, com a formação de urédias esporulantes, similar ao que ocorre em soja. De modo geral, todos os genótipos de caupi foram resistentes, não sendo identificado nenhum genótipo com lesão tipo TAN, indicativa de susceptibilidade. Em guandu foram identificados de genótipos imunes a genótipos completamente suscetíveis, com nível de esporulação semelhante ao que ocorre em soja. Nenhum genótipo de feijão-comum apresentou reação de imunidade, sendo identificados genótipos resistentes e suscetíveis com pouca esporulação do patógeno. O feijão comum e o guandu podem constituir importantes reservatórios para manutenção do

fungo no campo na ausência de plantas de soja e também servir como importantes fontes alternativas de genes de resistência a *P. pachyrhizi*.

CHAPTER 1

RESISTANCE OF GENOTYPES OF *VIGNA UNGUICULATA*, *CAJANUS CAJAN* AND *PHASEOLUS VULGARIS* TO THE ISOLATE UFVPP01 OF *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Sônia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Resistance of genotypes of *Vigna unguiculata*, *Cajanus cajan* and *Phaseolus vulgaris* to the isolate UFVPP01 of *Phakopsora pachyrhizi*.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Fabrício de Ávila Rodrigues.

The fungus *P. pachyrhizi*, etiological agent of soybean rust, has a wide host range that can act as sources of inoculum for Asian rust epidemics in soybean. However, a detailed analysis of the reaction of the different genotypes of these hosts to the pathogen remains to be conducted. Thus, this work aimed to evaluate the resistance of 55 genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata*), 55 of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and 13 of the common bean (*P. vulgaris*) to the single pustule isolate UFVPP01 of *P. pachyrhizi*. Five types of reactions to *P. pachyrhizi* were observed, ranging from immunity to susceptibility. All the cowpea genotypes were resistant Both immune and completely susceptible genotypes were identified in pigeon pea. In the common bean resistant and susceptible genotypes with little pathogen sporulation were identified. The common bean and pigeon pea can constitute important reservoirs for fungus maintenance in the field in the absence of soybean plants, as well as important alternative sources of resistance genes to *P. pachyrhizi*.

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow, é a principal doença fúngica da cultura da soja no Brasil. As perdas em grãos provocadas pela ferrugem asiática da soja somaram aproximadamente 4,5% da safra brasileira de soja em 2006/07, o que equivale a 2,67 milhões de toneladas de grãos ou U\$ 615,7 milhões, considerando o preço médio de U\$ 230,6 a tonelada de soja. Somando-se o custo, da operação de controle cuja média nacional ficou em 2,3 aplicações por hectare, o custo total da ferrugem asiática na safra 2006/07 foi de U\$ 2,19 bilhões (Guirra, 2007).

Phakopsora pachyrhizi ocorre no Hemisfério Leste desde 1902, sendo considerada altamente agressiva, causando danos de 10 a 40% na Tailândia, 10-90% na Índia, 10-50% no sul da China, 23-90% em Taiwan e 40% no Japão (Sinclair & Hartman, 1999). Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, comprometendo a formação e o enchimento de vagens e o peso final dos grãos (Yang *et al.* 1991).

P. pachyrhizi é um fungo biotrófico que pertence ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae, sendo classificado como uma ferrugem microcíclica autóica (McLean, 1979). A fase de urédia é comumente observada em soja e outros hospedeiros. Na urédia são produzidas grandes quantidades de uredósporos em vários ciclos durante o ciclo da cultura, que são facilmente disseminados pelo vento. Télias e teliósporos podem ser formados no final do ciclo da cultura sob condições de temperatura amenas e também em estudos de casa-de-vegetação (Yeh *et al.*, 1981). A germinação dos teliósporos e subsequente formação de basidiósporos somente foram observadas sob condições de laboratório por Saksirirat & Hoppe (1991).

O processo de infecção empregado por *P. pachyrhizi* envolve a deposição do urediniósporo na superfície do hospedeiro, germinação e formação do apressório, penetração do tecido vegetal diretamente através da cutícula, crescimento intercelular e formação dos haustórios. Aos oito dias após a penetração, é possível visualizar as urédias, principalmente na face abaxial das folhas e finalmente a liberação dos uredósporos.

Além da soja, *P. pachyrhizi* é capaz de infectar mais de 90 espécies em pelo menos 43 gêneros (Yeh et al., 1982). A infecção de *P. pachyrhizi* em plantas hospedeiras pode resultar em três tipos de reação: imunidade (ausência de sintomas visíveis da doença), lesões castanho claro (reação tipo “TAN”) e lesões castanho escuro (reação RB, “Reddish Brown”)(Bromfield & Hartwig, 1980; McLean, 1979). As lesões tipo TAN apresentam de duas a seis urédias e abundante esporulação, sendo típicas de uma interação suscetível, enquanto que as lesões RB apresentam esporulação esparsa, raramente com 1 ou 2 urédias, sendo indicativas de um certo grau de resistência. O tipo de lesão observado, depende do genótipo da planta hospedeira e do patógeno (Hartman et al., 2005).

O controle da ferrugem asiática é efetuado basicamente com fungicidas, principalmente triazóis e estrubilurinas. Embora a utilização de variedades resistentes seja a medida de controle mais desejada, não existe cultivares comerciais com nível de resistência que dispense o uso de fungicidas. Quatro genes de resistência já foram descritos (*Rpp1* a *Rpp4*), todavia, isolados capazes de suplantá-los já são conhecidos (Hartman et al., 2005).

Em virtude da existência de plantas hospedeiras infectadas, cultivadas ou não, durante todo o ano, no Brasil a ocorrência das primeiras infecções nos cultivos de soja depende apenas das condições climáticas. O momento da primeira aplicação de fungicida depende, portanto, das condições climáticas, da incidência e/ou severidade da doença, idade das plantas de soja, extensão das lavouras, capacidade de aplicação do fungicida em toda área no devido tempo, e, principalmente, do fungicida escolhido (Yorinori, 2005). Outras medidas de controle complementar como o plantio de cultivares precoces, o manejo nutricional e a rotação de culturas têm sido preconizadas na tentativa de reduzir o número de aplicações de fungicidas (Yorinori, 2005).

Como estratégia de manejo da doença, foi também implantado em 2006 o vazio sanitário nos estados do Mato Grosso e Goiás. Esta medida visa reduzir o inóculo primário do fungo *P. pachyrhizi* em plantios de soja. Desta forma, a possibilidade de incidência da doença no período vegetativo é menor e conseqüentemente, o número de aplicações de fungicida para controle também pode ser reduzido. Nestas regiões é proibido o cultivo de soja no período de entressafra, sendo eliminadas a soja voluntária ou tigüera. A partir deste ano, o vazio sanitário foi estendido para Mato Grosso do Sul, Tocantins, São Paulo, Minas Gerais e Maranhão, seguindo instruções normativas estaduais. O Paraná estuda a sua normatização para 2008.

O cultivo de genótipos suscetíveis de espécies hospedeiras de *P. pachyrhizi* em áreas adjacentes àquelas destinadas ao plantio de soja, ou mesmo no cultivo da safrinha pode comprometer a eficácia do vazio sanitário, permitindo o estabelecimento mais cedo do patógeno nas lavouras. Atualmente, o feijão-caupi está sendo introduzido no Cerrado dos estados do Piauí e Maranhão em lavouras recém-desbravadas, logo após o cultivo de arroz, no final da estação das águas (safrinha), em regime de cultivo bianual com soja (Zili et al., 2000).

No Mato Grosso do Sul, a cultura tem despertado interesse de produtores como alternativa para diversificação, com baixo risco, considerando os freqüentes veranicos que têm comprometido culturas menos tolerantes. Ensaio conduzidos de abril a outubro de 2005, em Chapadão do Sul (Cerrado), Aquidauana (Pantanal) e Dourados mostraram que mesmo enfrentando déficit hídrico em alguns momentos, principalmente na época de plantio de safrinha e excesso de chuvas em outros, os resultados quanto à produtividade não deixaram a desejar quando comparados aos números obtidos em regiões tradicionalmente produtoras de feijão-caupi.

O plantio de milho consorciado com guandu, feijão-comum e outras espécies a fim de desenvolver uma boa cobertura e melhorar a estrutura do solo são recomendados para o cultivo de safrinha no Mato Grosso do Sul (Ceccon et al., 2007). Assim, é fundamental conhecer o comportamento de genótipos dessas plantas hospedeiras, visando subsidiar a indicação de cultivares que apresentem resistência a *P. pachyrhizi* e não comprometam a eficácia do vazio sanitário.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar e caracterizar a reação de genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), guandu (*Cajanus cajan*) e feijão-comum (*P. vulgaris*) ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e caracterização do isolado monopustular.

O isolado monopustular PPUFV01 foi obtido a partir de uredósporos derivados de folhas de soja com sintomas de ferrugem da soja coletadas em 2004, no Campo Experimental da Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. Uredósporos desse isolado foram coletados, armazenados a -80°C , e multiplicados em soja UFVS 2002, em condições de casa de vegetação. A identificação em nível de espécie foi feita por meio da análise de PCR utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos que amplificam a região ITS, conforme descrito por Frederick et al. (2002), e na análise de seqüência do fragmento amplificado.

O fragmento obtido na PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega), que foi posteriormente transformado em *Escherichia coli* por choque térmico. As colônias contendo plasmídeos com insertos foram identificadas por meio de PCR utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R que flanqueiam o sítio de clonagem. As condições de termociclagem foram 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Um clone contendo o fragmento de tamanho esperado foi selecionado para o sequenciamento. A seqüência obtida foi comparada com seqüências depositadas no banco de dados NCBI por meio do algoritmo BLASTn e alinhadas utilizando o programa *Clustal W* (Thompson et al., 1994).

2.2. Material vegetal, cultivo das plantas e inoculação.

Foram avaliados 55 genótipos de feijão-caupi (*V. unguiculata*), 55 genótipos de guandu (*C. cajan*) e 13 genótipos de feijão-comum (*P. vulgaris*) quanto à resistência a *P.pachyrhizi* (Tabela 1). As sementes foram pré-germinadas, para que a emergência fosse homogênea, e então as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 2 litros, contendo solo misturado com areia e esterco na proporção 3:1:1, previamente tratado com brometo de metila.

As plantas com dois trifólios totalmente expandidos foram inoculadas com uma suspensão de $2,0 \times 10^5$ uredósporos do isolado PPUFV01.mL⁻¹ de água destilada + Tween 20 (0.01%), mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C no escuro, durante 24 h e depois transferidas para a casa-de-vegetação, onde permaneceram durante todo o período de avaliação. Plantas de soja do cultivar suscetível UFVS 2002 foram usadas como testemunha em todos os ensaios. Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizados com 5 repetições, sendo que cada repetição foi constituída por um vaso contendo uma planta. Foram avaliadas no mínimo dez plantas de cada genótipo em dois ensaios independentes.

2.3. Avaliação da resistência ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

A caracterização da reação nos genótipos foi feita visualmente, sendo analisados as folhas unifoliadas, o primeiro e segundo trifólios, utilizando uma escala com 5 classes, onde a classe 0 representa ausência de sintomas macroscópicos ou imunidade; a classe 1 pequenas pontuações necróticas; a classe 2, lesões necróticas sem urédias; a classe 3, lesões com a presença de urédias não esporulantes, e a classe 4, as lesões necróticas, ou não, com

urédias esporulantes (R4). Foram ainda quantificados o período de incubação (PI), período latente (PL) e número de lesões/cm². O número de lesões/cm² foi quantificado no momento em que o período de incubação foi completado.

Foi efetuada a avaliação microscópica das lesões de genótipos representativos de cada classe de reação a *P. pachyrhizi*, após o período latente ser sido completado. Para feijão-caupi e guandu, cortes foliares de aproximadamente 1 cm² apresentando os sintomas foram coletados e colocados em frascos de vidro contendo uma solução de etanol + ácido acético na proporção 3:1 para diafanização. A solução foi trocada até a remoção total da clorofila. A seguir, os fragmentos foram transferidos para uma solução de lactofenol por pelo menos 24 h, e então corados em solução de lactofenol + azul de algodão 0,1% e posteriormente montados em lâminas para exame ao microscópio óptico. Em cada fragmento foi avaliado o tipo de lesão, o número de lesões e o número de urédias/lesão (quando essas estavam presentes) e ainda se essas urédias apresentavam-se abertas ou fechadas. Foram avaliados quatro fragmentos/genótipo.

Tabela 1. Descrição dos genótipos de feijão-caupi (*V. unguiculata*), guandu (*C. cajan*), feijão-comum (*P. vulgaris*) e soja (*G. max*) utilizados para avaliação da resistência à *P. pachyrhizi*. A descrição de alguns genótipos de guandu foi feita com base nos trabalhos de Provazi *et al.* (2007) e Godoy *et al.* (2004).

Hospedeiros				Descrição
Nome científico	Nome comum	Genótipo	Código	
<i>G. max</i>	Soja	cv. UFVS 2002	Gm 1	Cultivar desenvolvido pela UFV, utilizado nos ensaios como genótipo suscetível a <i>P. pachyrhizi</i>
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-505G-11	Vu 1	Canapuzinho x BR17-Gurguéia
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-507G-1	Vu 2	TE90-180-88F x canapuzinho
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-507G-8	Vu 3	BR14-Mulato x Canapuzinho
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-508G-1	Vu 4	-
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-510G-8	Vu 5	Paulista x TE90-180-88F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-510F-16	Vu 6	Paulista x TE90-180-88F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	TE97-309G18	Vu 7	CNCx 405-24F x CNCx689-128G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	TE97-304G-4	Vu 8	CNCx 405-17F x TE94-268-3D
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	TE97-304G-12	Vu 9	CNCx 405-17F x TE94-268-3D
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	TE97-309G-24	Vu 10	CNCx405-24F x CNCx689-128G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-541F-15	Vu 12	TE93-210-13F x TE96-282-22G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-541F-18	Vu 13	TE93-210-13F x TE96-282-22G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-541F-21	Vu 14	TE93-210-13F x TE96-282-22G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-542F-5	Vu 15	TE96-282-22G x TE93-210-13F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-542F-7	Vu 16	TE96-282-22G x TE93-210-13F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-547F-2	Vu 17	(TE97-406-1F x IT87D-611-3) x TE97-404-1F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BRS Paraguaçu	Vu 18	BR10-Piauí x Aparecido Moita
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BR 17 Gurguéia	Vu 19	BR10-Piauí x CE-315
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	CHCx 409-11F-P-2	Vu 20	-
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-537F-1	Vu 21	TE96-282-22G x IT87D-611-3
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-537F-4	Vu 22	TE96-282-22G x IT87D-611-3
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-541F-5	Vu 23	TE93-210-13F x TE96-282-22G

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Hospedeiros				Descrição
Nome científico	Nome comum	Genótipo	Código	
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-541F-8	Vu 24	TE93-210-13F x TE96-282-22G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	IT93K-93-10	Vu 25	IITA,Nigéria
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Pretinho	Vu 26	Pará
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Fradinho-2	Vu 27	São Paulo
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-519D-1-1-5	Vu 28	CE-315 x Evx92-25E
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC00-544D-10-1-2-2	Vu 29	(Califórnia Bleckeye 3 x BR14-Mulato) x Califónia Bleckeye 3
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC00-544D-14-1-2-2	Vu 30	(Califórnia Bleckeye 3 x BR14-Mulato) x Califónia Bleckeye 3
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC00-553D-8-1-2-2	Vu 31	TE97-404-1F x TE97-404-3F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC00-553D-8-1-2-3	Vu 32	TE97-404-1F x TE97-404-3F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC00-561G-6	Vu 33	TE97-406-1F x (TE97-406-1F x IT87D-611-3)
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Evx63-10E	Vu 34	CNCx926-5F x Paulista
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC-01-649E-2	Vu 35	-
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Evx91-2E-2	Vu 36	(CNCx926-5F x Paulista) X CNC1735
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-557F-2	Vu 37	(TE96-282-22G x IT87D-611-3) x TE97-411-1F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BRS Guariba	Vu38	IT85-2687 x TE87-98-8G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Patativa	Vu39	CNC1735 x (CNCx926-5F x Paulista)
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Vita-7	Vu 40	ITA,Nigéria
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BR2-Bragança	Vu41	Costa Rica
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BRS-Urubuquara	Vu44	Pará
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Mazagão	Vu45	Amapá
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BRS-Rouxinol	Vu47	Bahia
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	EPACE-10	Vu48	Ceará

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Hospedeiros				Descrição
Nome científico	Nome comum	Genótipo	Código	
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BR14-Mulato	Vu49	Goiânia
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	CNCx689-128F	Vu50	Goiânia
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC99-510-16-6-1	Vu51	Canapuzinho x BR17-Gurguéia
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	MNC01-649E-1	Vu 52	TE90-180-88F x canapuzinho
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	BR10 Piauí	Vu53	BR14-Mulato x Canapuzinho
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Azul	Vu54	-
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Consebiola	Vu55	Paulista x TE90-180-88F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	IPA206	Vu56	Paulista x TE90-180-88F
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Pele de Moça	Vu58	CNCx 405-24F x CNCx689-128G
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Paulistinha	Vu 59	CNCx 405-17F x TE94-268-3D
<i>V. unguiculata</i>	Feijão-caupi	Vila Nova	Vu60	CNCx 405-17F x TE94-268-3D
<i>C. cajan</i>	Guandu	G20	Cc 1	Material coletado em Palmas-TO
<i>C. cajan</i>	Guandu	G21	Cc 2	Material coletado em Palmas-TO
<i>C. cajan</i>	Guandu	Anão	Cc 3	-
<i>C. cajan</i>	Guandu	Caqui	Cc 4	-
<i>C. cajan</i>	Guandu	Cv. Fava larga	Cc 5	-
<i>C. cajan</i>	Guandu	Cv. Iapar 43	Cc 6	-
<i>C. cajan</i>	Guandu	G22	Cc 7	Material coletado em Palmas-TO
<i>C. cajan</i>	Guandu	Vinho	Cc 8	Material coletado em Palmas-TO
<i>C. cajan</i>	Guandu	G1m-95	Cc 9	Cor primária da flor amarelo-alaranjado e cor secundária da flor vermelho (safra 2003).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G3-94	Cc 10	safra 2002
<i>C. cajan</i>	Guandu	G5-94	Cc 11	safra 2003
<i>C. cajan</i>	Guandu	G6-95	Cc 12	safra 2002
<i>C. cajan</i>	Guandu	G8-95	Cc 13	Cor primária da flor amarelo-limão e cor secundária da flor amarelo-cobalto (safra 2004)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G9m-97	Cc 14	safra 2005

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Hospedeiros				Descrição
Nome científico	Nome comum	Genótipo	Código	
<i>C. cajan.</i>	Guandu	G10-94	Cc 15	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo (safra 2004)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G19m-95	Cc 16	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor vermelho-eritrato (safra 2000)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G27-94	Cc 17	safra 2004
<i>C. cajan</i>	Guandu	G29b-94	Cc 18	safra 2001
<i>C. cajan</i>	Guandu	G29m-94	Cc 19	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo (safra 2004)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G39-94	Cc 20	safra 2004
<i>C. cajan</i>	Guandu	G40-95	Cc 21	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor vermelho-rubi (safra 2003)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G47-94	Cc 22	safra 2001
<i>C. cajan</i>	Guandu	G48-95	Cc 23	Cor primária da flor amarelo-alaranjado e cor secundária da flor vermelho-arroxeadado (safra 2004)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G57-95	Cc 24	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo com estrias vermelhas (safra 2000)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G58-95	Cc 25	safra 2002
<i>C. cajan</i>	Guandu	G59-95	Cc 26	safra 2002
<i>C. cajan</i>	Guandu	G66-95	Cc 27	safra 2003
<i>C. cajan</i>	Guandu	G101-97	Cc 28	safra 2005
<i>C. cajan</i>	Guandu	G108-99	Cc 29	Cor primária da flor amarelo-cobalto e cor secundária da flor amarelo-mimosa com estrias púrpura-rodamina (safra 2001)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G109-99	Cc 30	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor amarelo-mimosa com estrias púrpura-beterraba safra 2004

Continua...

Tabela 1. (Continuação)

Hospedeiros				Descrição
Nome científico	Nome comum	Genótipo	Código	
<i>C. cajan</i>	Guandu	G118-99	Cc 31	safra 2002
<i>C. cajan</i>	Guandu	G119-99	Cc 32	Cor primária da flor amarelo-alaranjado e cor secundária da flor amarelo-alaranjado com estrias vermelho-arroxeadas (safra 2004).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G121-99	Cc 33	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo (safra 2003).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G123-99	Cc 34	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo com estrias vermelhas (safra 2004).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G124-95	Cc 35	safra 2003
<i>C. cajan</i>	Guandu	G127-97	Cc 36	safra 2003
<i>C. cajan</i>	Guandu	G137-99	Cc37	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor vermelho-rubi (safra 2001).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G138-99	Cc 38	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor vermelho-narstúcio (safra 2002).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G142-95	Cc 39	Cor primária da flor amarelo-limão e cor secundária da flor amarelo-mimosa com estrias púrpura-petúnia (safra 2004)
<i>C. cajan</i>	Guandu	G146-97	Cc 40	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo (safra 2005).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G149-99	Cc 41	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor vermelho-rubi (safra 2000).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G154-95	Cc 42	safra 2001
<i>C. cajan</i>	Guandu	G167-97	Cc 43	safra 2002
<i>C. cajan</i>	Guandu	G168-99	Cc 44	Cor primária da flor amarelo e cor secundária da flor amarelo com estrias vermelhas (safra 2002).
<i>C. cajan</i>	Guandu	G184-97	Cc 45	safra 2002.
<i>C. cajan</i>	Guandu	G186-99	Cc 46	Cor primária da flor amarelo-cromo e cor secundária da flor amarelo-cobalto com estrias rosa-magenta (safra 2004).

Continua...

Tabela 1. (Final)

Hospedeiros				Descrição
Nome científico	Nome comum	Genótipo	Código	
<i>C. cajan</i>	Guandu	G119-99(10)	Cc 54	Planta selecionada para ser utilizada como progenitor resistente.
<i>C. cajan</i>	Guandu	G146-97(3)	Cc 55	Planta selecionada para ser utilizada como progenitor resistente.
<i>P. vulgaris</i>				Cultivar desenvolvido por UFLA/UFV/EPAMIG/EMBRAPA e recomendada para Minas Gerais.
	Feijão-comum	BRS-MG Talismã	Pv 1	Cultivar desenvolvida pela UFV.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	OPNS 331	Pv 2	
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Carnaval	Pv 3	
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	BRS Valente	Pv 4	Cultivar desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	VC3	Pv 5	Cultivar desenvolvida pela UFV.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Ouro Negro	Pv 6	Cultivar desenvolvida em Honduras (Honduras 35) resistente a <i>Uromyces appendiculatus</i> e <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Pérola	Pv 7	Proveniente de trabalho de seleção de linhas puras da cultivar Aporé, realizado pela Embrapa Arroz e Feijão.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Feijão vagem	Pv 8	Cultivar de porte indeterminado de origem da América Central.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Vermelhinho	Pv 9	Cultivar desenvolvido por UFLA/UFV/EPAMIG/EMBRAPA e recomendada para Minas Gerais.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Vi-4899	Pv 10	Cultivar desenvolvida pela UFV.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Ouro Branco	Pv 11	Cultivar desenvolvida pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical - Colômbia).
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Ouro Vermelho	Pv 12	Cultivar desenvolvido pelo convênio UFV/EPAMIG/UFLA e recomendada para Minas Gerais.
<i>P. vulgaris</i>	Feijão-comum	Vermelho 2157	Pv 13	Cultivar desenvolvida pelo CIAT.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização do isolado PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

A análise em gel de agarose 2% dos produtos da PCR confirmou a identidade do isolado monopustular PPUFV01 utilizado neste trabalho, como *P. pachyrhizi* (Figura 1). Na comparação entre a seqüência do isolado PPUFV01 com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI, o valor de similaridade foi $2e^{-169}$ com uma identidade de 100% com a região ITS1 do isolado MUT-Zimbabue de *P. pachyrhizi* (Figura 2).

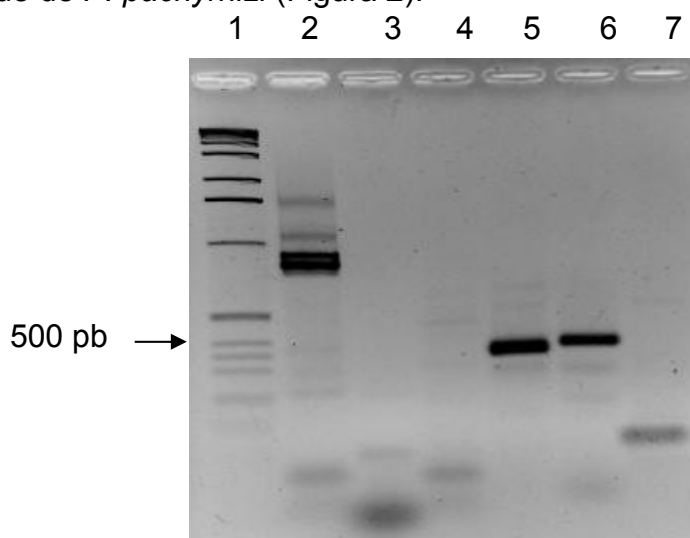


Figura 1. Análise da amplificação da região ITS para a confirmação da espécie do isolado PPUFV01. 1-marcador 1 kb; 2-DNA de soja + oligonucleotídeos actina de soja; 3-DNA do fungo + oligonucleotídeos actina de soja; 4-DNA do fungo + oligonucleotídeos Pme1 e Pme2 (*P. meibomiae*); 5-DNA do isolado PPUFV01 + oligonucleotídeos Ppa1 e Ppa 2 (*P. pachyrhizi*); 6-DNA do isolado PPUFV01 + oligonucleotídeos Ppa3 e Ppa4 (*P. pachyrhizi*); 7-DNA do isolado PPUFV01 + oligonucleotídeos Ppm1 e Ppm2 (*P. pachyrhizi* e *P. meibomiae*).

135	TAAGATCTTTGGGCAATGGTAGCTTTGAAAAAAGCTGCAACCCACCTATTAATCATAATC
3	TAAGATCTTTGGGCAATGGTAGCTTTGAAAAAAGCTGCAACCCACCTATTAATCATAATC
195	TTTTTTTTTTAACTCAAAGTCAAATAGAATGTTTTATAAATTTAAATATATATATAACTT
63	TTTTTTTTTTAACTCAAAGTCAAATAGAATGTTTTATAAATTTAAATATATATATAACTT
255	TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAATTAA
123	TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAATTAA
315	TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAGTTTTTGAACGCACCTTGCACCTTTTGGTA
183	TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAGTTTTTGAACGCACCTTGCACCTTTTGGTA
375	TTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTGATGAAATCTTCTCAACATTATTTCTTTTTAAA
243	TTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTGATGAAATCTTCTCAACATTATTTCTTTTTAAA
435	GGAAATTGTTGGATTTTGGAGTGTGTC
303	GGAAATTGTTGGATTTTGGAGTGTGTC

Figura 2. Alinhamento das seqüências da região ITS do gene do RNA ribossomal de *P. pachyrhizi* depositada no NCBI (Acesso AF333499 na linha superior) e a seqüência do isolado PPUFV01 (linha inferior), mostrando 100% de identidade de nucleotídeos.

3.2. Reação dos genótipos de feijão-caupi ao isolado PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

Em caupi, os sintomas só foram observados nas folhas cotiledonares, com exceção dos genótipos Vu30, Vu32, 34 e 36,. Esses eram inicialmente reconhecidos como pequenas pontuações avermelhadas na face adaxial das folhas cotiledonares, tempo necessário para que o período de incubação fosse completado. Com o passar do tempo foi possível observar os sintomas na face abaxial e raramente no primeiro trifólio da planta. Aos 13 dias após a inoculação, quando o período latente foi considerado completo para alguns genótipos, foi possível visualizar urédias nas lesões na face abaxial das folhas de alguns genótipos. O tempo máximo de avaliação do ensaio foi de 20 dias após a inoculação, devido ao fato de as folhas cotiledonares apresentarem-se em estágio avançado de senescência impedindo que a avaliação prosseguisse por um período maior.

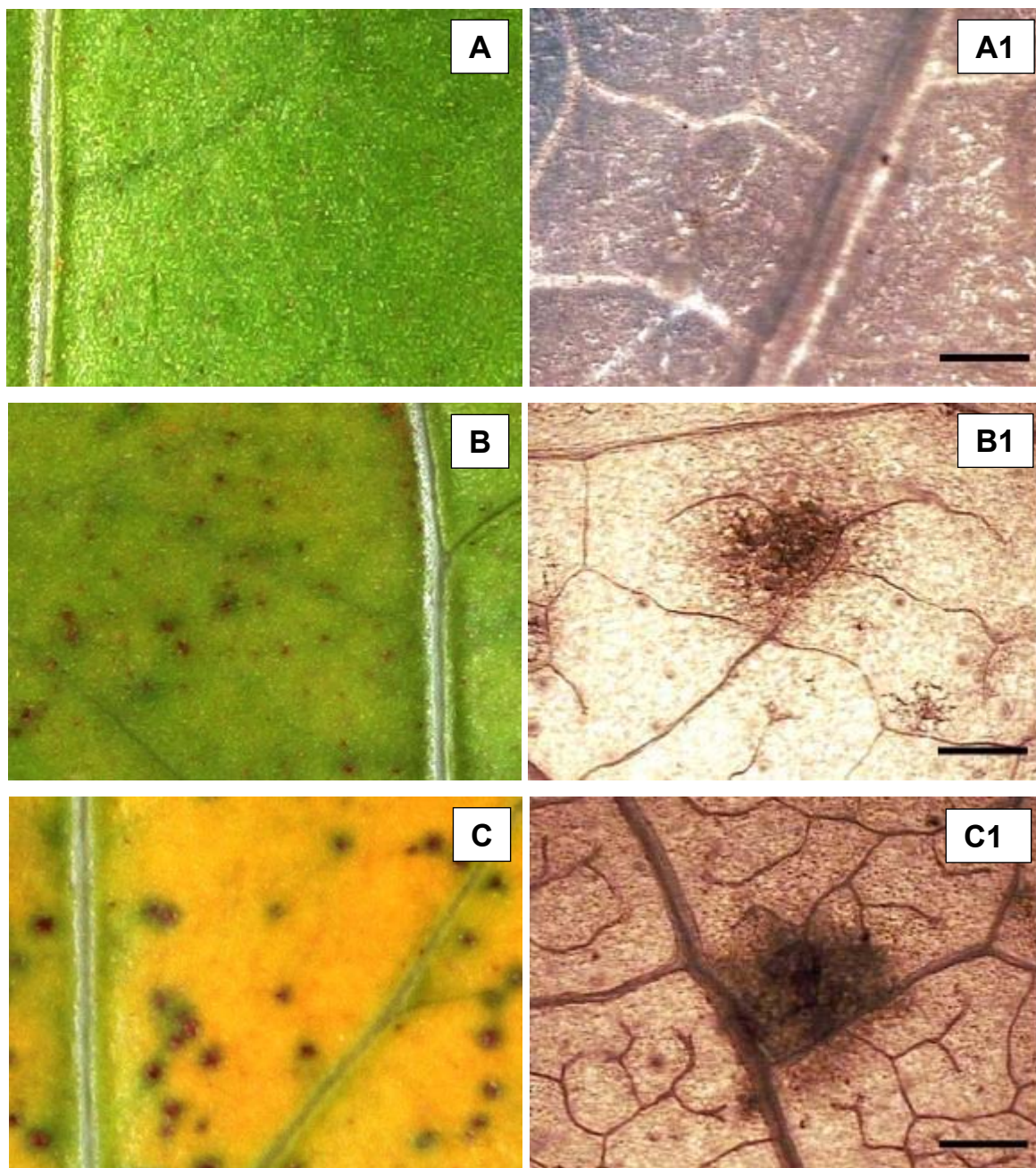


Figura 3. Reações identificadas nos genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em resposta a infecção pelo isolado monospustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi*. A = reação tipo 0; B = reação tipo 1; C = reação tipo 2; D = reação tipo 3 e E = reação tipo 4 (Fotografias feitas com máquina fotográfica digital). As fotografias A1, B1, C1, D1 e E1 correspondem a lesões representadas nas fotografias A, B, C, D e E, após clareamento e fotomicrografadas com aumento de 4 X. As setas mostram a presença de urédias nas lesões e as barras nas fotografias correspondem a uma extensão de 300 μ m.

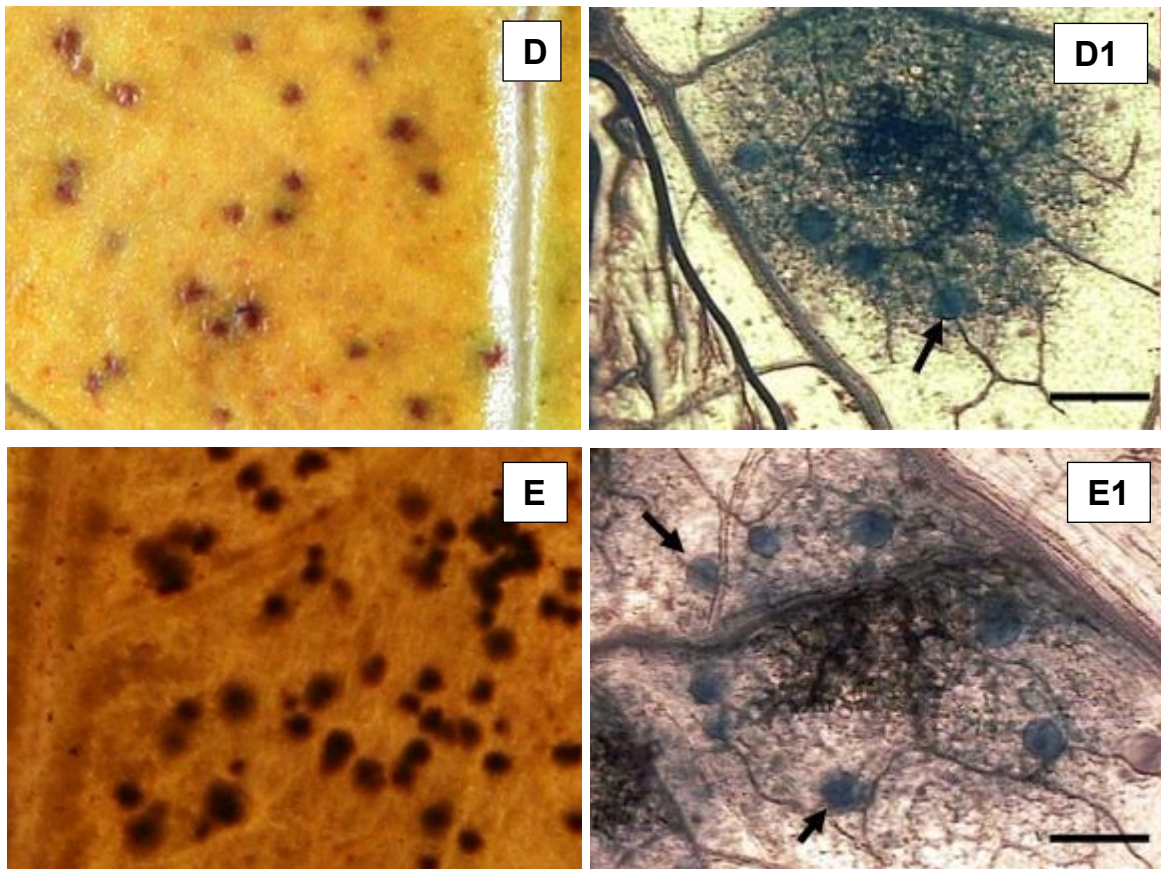


Figura 3. continuação.

O período de incubação em feijão-caupi variou de 7 a 14 dias, e o latente de 13 a 20 dias, no tempo máximo de avaliação do ensaio que foi de 20 dias. O período latente e o período de incubação foram completados de maneira homogênea entre as repetições em cada genótipo e o desvio padrão calculado para essas variáveis foi zero. O número médio de lesões/cm², que mede a frequência de infecção, foi avaliado para todos os cultivares, inclusive aqueles que não apresentaram PL e variou de 3 a 34 lesões/cm² nos diferentes genótipos de feijão-caupi. Os genótipos foram agrupados em 6 grupos de acordo com o número médio de lesões/cm² (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização da resistência de diferentes genótipos de feijão-caupi ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi*, por meio de componentes macroscópicos de resistência.

Genótipo	PI (d.a.i)* (a)	PL (d.a.i)* (b)	Lesões/cm ² (c)	Reação (d)
Vu 21	-	-	0	0
Vu 3	-	-	0	0
Vu 40	-	-	0	0
Vu 5	11	-	0	0
Vu 7	-	-	0	0
Vu 6	-	-	0	0
Vu 22	-	-	0	0
Vu 1	10	-	14 ± 5,7	1
Vu 15	12	-	4 ± 1,9	1
Vu 17	7	-	12 ± 1,4	1
Vu 18	13	-	8 ± 2,8	1
Vu 19	11	-	10 ± 2,1	1
Vu 20	11	-	8 ± 2,5	1
Vu 23	11	-	10 ± 3,9	1
Vu 24	11	-	12 ± 8,1	1
Vu 29	9	-	18 ± 3,0	1
Vu 34	11	-	10 ± 3,0	1
Vu 4	7	-	6 ± 2,2	1
Vu 8	12	-	8 ± 1,3	1
Vu38	7	-	21 ± 6,4	1
Vu41	7	-	16 ± 4,3	1
Vu47	13	-	7 ± 3,2	1
Vu55	7	-	10 ± 2,4	1
Vu56	7	-	25 ± 4,8	1
Vu 10	11	-	10 ± 2,1	2
Vu 13	11	-	7 ± 3,0	2
Vu 14	11	-	3 ± 1,0	2
Vu 16	11	-	14 ± 2,2	2
Vu 25	11	-	19 ± 7,6	2
Vu 26	14	-	14 ± 2,2	2
Vu 27	11	-	12 ± 2,5	2
Vu 28	7	-	6 ± 1,7	2
Vu 35	11	-	12 ± 3,0	2
Vu 37	11	-	16 ± 4,4	2
Vu 52	11	-	12 ± 3,8	2
Vu 59	11	-	15 ± 4,0	2
Vu 9	11	-	12 ± 4,9	2
Vu39	7	-	26 ± 10,3	2

Continua....

Tabela 3. (Final)

Genótipo	PI (d.a.i)* (a)	PL (d.a.i)* (b)	Lesões/cm ² (c)	Reação (d)
Vu44	7	-	13 ± 3,3	2
Vu48	7	-	26 ± 2,1	2
Vu50	7	-	20 ± 4,8	2
Vu51	7	-	27 ± 7,0	2
Vu53	7	-	32 ± 4,5	2
Vu54	7	-	24 ± 3,7	2
Vu58	7	-	25 ± 5,0	2
Vu 12	7	20	10 ± 1,6	3
Vu 2	7	20	22 ± 2,6	3
Vu 31	11	15	11 ± 1,7	3
Vu 33	7	20	14 ± 3,8	3
Vu 36	11	18	14 ± 6,0	3
Vu45	7	15	34 ± 3,4	3
Vu49	7	13	32 ± 7,9	3
Vu60	7	13	25 ± 3,7	3
Vu 30	11	15	17 ± 3,9	4
Vu 32	11	15	33 ± 9,5	4
Soja UFVS 2002	6	9	23 ± 3,3	TAN

(a)= período de incubação; (b)= período latente; (c)= média da contagem de lesões em 4 repetições/genótipo; (d)= caracterização da reação dos genótipos; *d.a.i = dias após a inoculação, o traço indica que o PI ou PL não foram completados para aquele genótipo.

A análise de microscopia dos fragmentos diafanizados permitiu correlacionar os diferentes tipos de reações com diferentes eventos celulares nos genótipos Vu 3 (0), Vu 15 (1), Vu 36 (2), Vu 31 (3) e Vu 30 (4), tidos como representativos de cada classe identificada. Esta análise também permitiu uma avaliação mais precisa do número de lesões/cm² e do número de urédias por lesão. No genótipo Vu 31 formaram-se em média 5 urédias/lesão, enquanto no genótipo Vu 30 formaram-se 7 urédias/lesão (Tabela 4). A reação 0, de imunidade, foi observada em 7 genótipos (13%), 17 genótipos apresentaram a reação 1 (30%), 21 genótipos apresentaram a reação 2 (40%), 8 a reação 3 (13%) e somente 2 genótipos (Vu 32 e Vu 30) apresentaram a reação 4 (4%). Estes dois genótipos foram também os únicos a apresentarem lesões no primeiro trifólio.

Tabela 4. Caracterização citológica da resistência de genótipos selecionados de feijão-caupi ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

Genótipo	Lesões/cm ² (a)	Urédias/lesão (b)	Reação (c)
Vu 3	-	-	0
Vu 15	4 ± 1,9	-	1
Vu 36	14 ± 6,0	-	2
Vu 31	11 ± 1,6	5 ± 0,94	3
Vu 30	17 ± 3,9	6 ± 1,5	4
Soja UFVS 2002	23 ± 3,3	4 ± 1,1	TAN

(a)= média da contagem de lesões em 4 repetições; (b)= média da contagem de urédias em 30 lesões/genótipo; (c)= caracterização da reação dos genótipos

3.3. Reação dos genótipos de guandu ao isolado PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

Em guandu, o aparecimento dos sintomas foi simultâneo em toda a planta, sendo visualizados primeiramente na face abaxial das folhas. As lesões foram angulares, delimitadas pelos feixes vasculares adjacentes ao ponto de infecção. Nos estágios posteriores de desenvolvimento, as lesões ficaram maiores e algumas vezes coalesceram, tornando-se marrons, similar ao que acontece em soja suscetível. A reação tipo 3 em guandu foi similar à reação RB de soja, onde foi observada uma esporulação mais esparsa e a reação tipo 4 foi tipicamente uma reação tipo TAN (Figura 4).

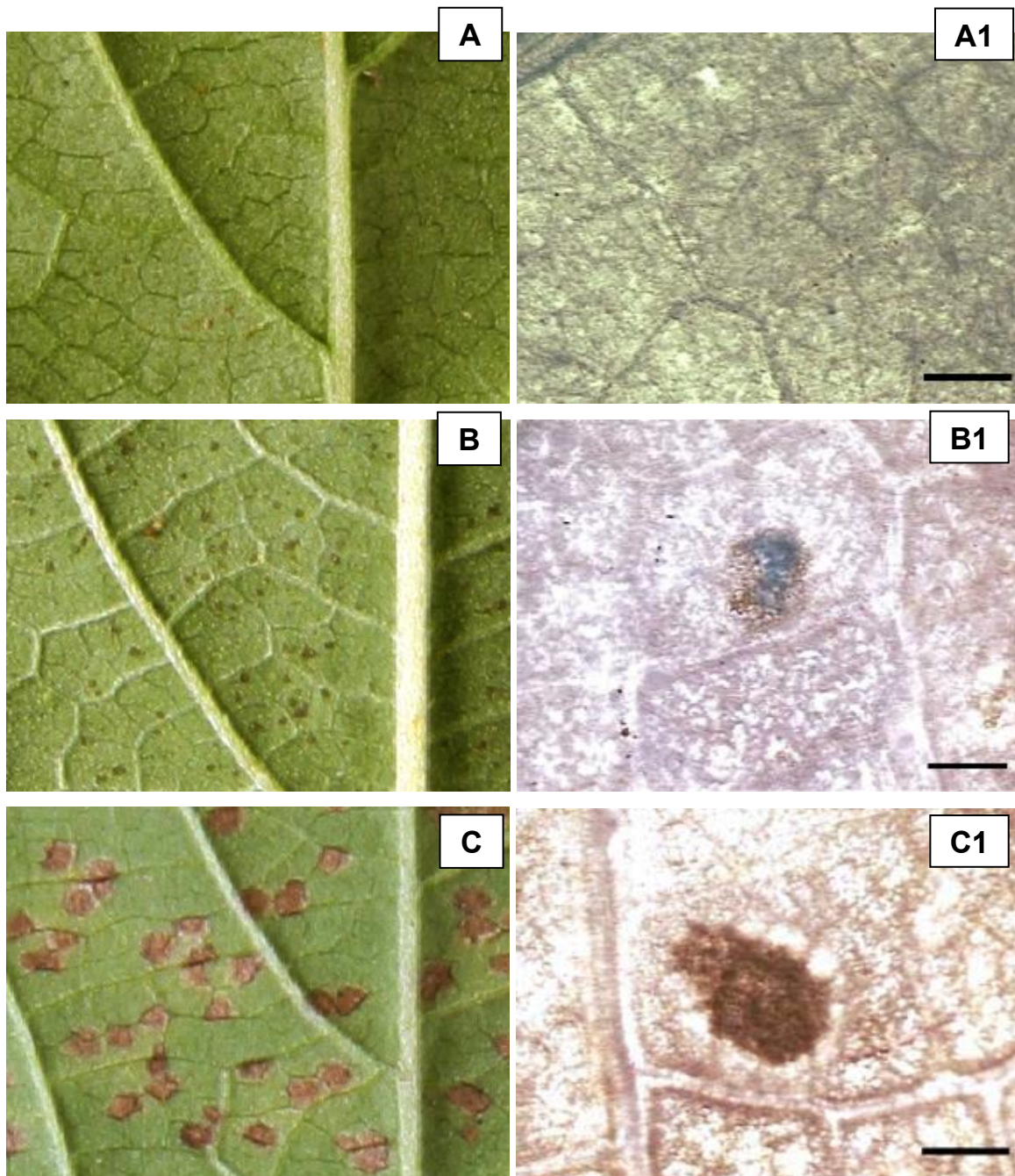


Figura 4. Reações identificadas nos genótipos de guandu (*Cajanus cajan*) ao isolado monopustular PPUFV01 *P. pachyrhizi*. A = reação tipo 0; B = reação tipo 1; C = reação tipo 2; D = reação tipo 3 e E = reação tipo 4 (Fotografias feitas com máquina fotográfica digital). As fotografias A1, B1, C1, D1 e E1 correspondem a lesões representadas nas fotografias A, B, C, D e E, após clareamento e fotomicrografadas com aumento de 4 X. As setas mostram a presença de urédias nas lesões e as barras nas fotografias correspondem a uma extensão de 300 μm .

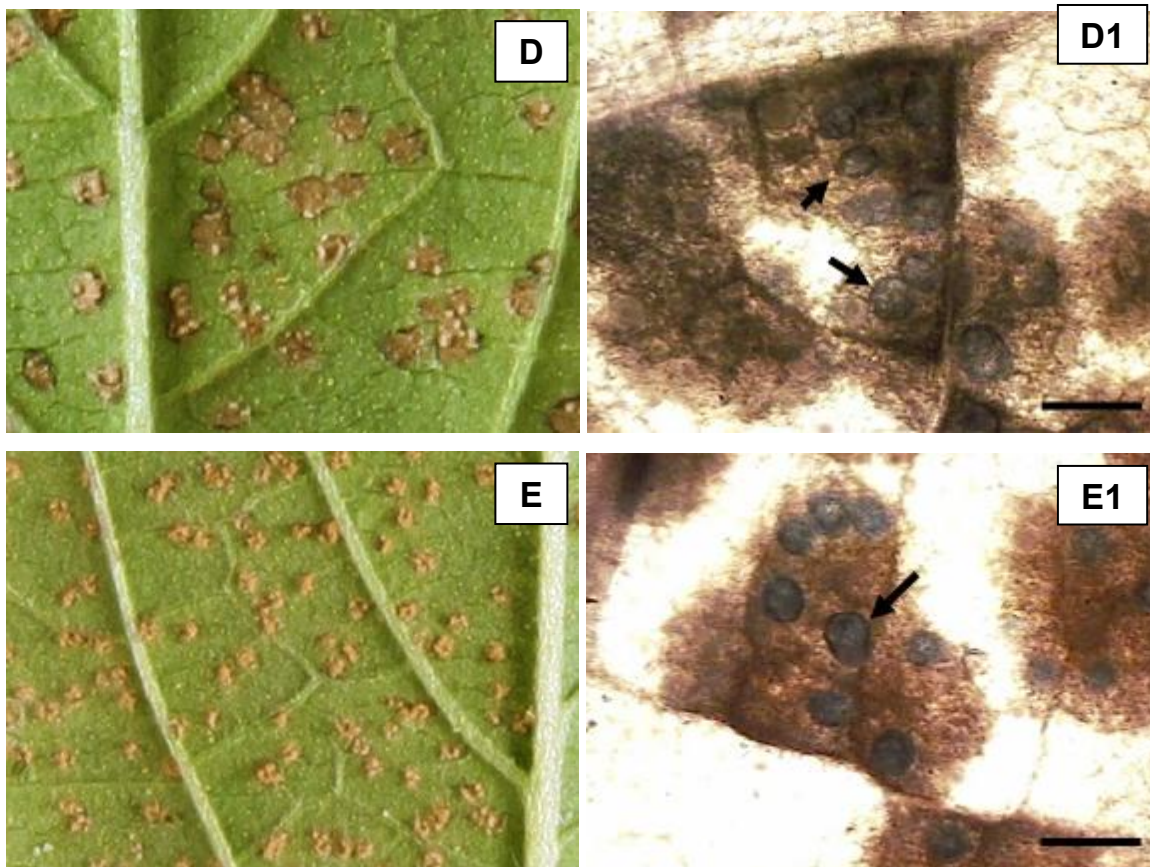


Figura 4. continuação.

O período de incubação variou de 6 a 16 d.a.i. O período latente foi completado entre 13 e 17 d.a.i. O período latente e o período de incubação foram completados de maneira homogênea entre as repetições em cada genótipo e o desvio padrão calculado para essas variáveis foi zero. O número médio de lesões/cm² variou de 3 a 36 nos genótipos de guandu (Tabela 5). Houve diferença significativa entre os genótipos e 5 grupos foram formados de acordo com o número médio de lesões/cm².

Tabela 5. Caracterização dos componentes macroscópicos de resistência ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi* nos diferentes genótipos de guandu.

Genótipo	PI (d.a.i)* (a)	PL (d.a.i)* (b)	Lesões/cm ² (c)	Reação (d)
Cc 13	-	-	0	0
Cc 26	-	-	16 ± 4,6	0
Cc 27	-	-	15 ± 4,5	0
Cc 28	-	-	0	0
Cc 29	-	-	0	0
Cc 30	-	-	0	0
Cc 31	-	-	0	0
Cc 32	-	-	0	0
Cc 35	-	-	0	0
Cc 36	-	-	0	0
Cc 37	-	-	0	0
Cc 38	-	-	0	0
Cc 40	-	-	0	0
Cc 41	-	-	0	0
Cc 43	-	-	0	0
Cc 44	-	-	0	0
Cc 45	-	-	0	0
Cc 50	-	-	0	0
Cc 51	-	-		0
Cc 52	-	-	0	0
Cc 53	-	-	0	0
Cc 54	-	-	0	0
Cc 55	-	-	0	0
Cc2	13	-*	15 ± 1,0	1
Cc1	10	-	22 ± 7,4	2
Cc21	10	-	11 ± 1,0	2
Cc25	10	-	9 ± 1,2	2
Cc33	12	-	27 ± 11,0	2
Cc34	9	-	5 ± 3,0	2
Cc42	10	-	3 ± 0,4	2
Cc46	18	-	17 ± 5,0	2
Cc3	6	9	15 ± 2,5	3
Cc4	6	9	16 ± 5,7	3
Cc5	6	9	13 ± 7,5	3
Cc6	6	9	36 ± 3,3	3
Cc8	6	9	19 ± 2,0	3

Continua...

Tabela 5. (Final)

Genótipo	PI (d.a.i)* (a)	PL (d.a.i)* (b)	Lesões/cm² (c)	Reação (d)
Cc11	6	9	19 ± 0,3	3
Cc12	12	17	18 ± 12,1	3
Cc14	6	10	15 ± 5,4	3
Cc15	6	10	14 ± 2,3	3
Cc16	6	10	10 ± 4,3	3
Cc17	6	9	20 ± 3,7	3
Cc18	10	13	20 ± 5,7	3
Cc22	6	9	10 ± 2,3	3
Cc23	6	9	18 ± 4,1	3
Cc24	11	13	14 ± 6,7	3
Cc39	12	17	12 ± 1,2	3
Cc48	6	12	17 ± 0,0	3
Cc49	6	12	18 ± 2,5	3
Cc7	10	13	17 ± 5,4	4
Cc9	10	13	18 ± 3,0	4
Cc10	7	10	17 ± 0,7	4
Cc19	10	13	15 ± 1,3	4
Cc20	10	13	18 ± 2,0	4
Cc47	6	13	19 ± 8,9	4
Soja UFVS 2002	6	9	22 ± 3,7	TAN

(a)= período de incubação; (b)= período latente; (c)= média da contagem de lesões em 4 repetições/genótipo; (d)= caracterização da reação dos genótipos; *d.a.i = dias após a inoculação.

A reação dos genótipos Cc 40 (I), Cc 2 (R1), Cc 1(R2), Cc 24 (R3) e Cc 10 (R4) foi analisada citologicamente (Figura 6). O genótipo Cc 24 apresentou uma média de 3 urédias/lesão e no genótipo Cc 10 a média foi de 6 urédias/lesão (Tabela 6). A reação de imunidade foi identificada em 23 genótipos (42%), 1 genótipo apresentou a reação 1 (2%), 7 genótipos apresentaram a reação 2 (13%), 18 a reação 3 (32%) e 6 genótipos apresentaram reação 4 (11%) de suscetibilidade, caracterizada por lesões com intensa esporulação.

Tabela 6. Caracterização citológica das diferentes reações de genótipos selecionados de guandu ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

Genótipo	Lesões/cm ² (a)	Urédias/lesão (b)	Reação (c)
Cc 40	-	-	0
Cc 2	15 ± 0,9	-	1
Cc 1	22 ± 7,4	-	2
Cc 24	14 ± 6,7	3 ± 0,9	3
Cc 10	17 ± 0,7	6 ± 0,9	4
Soja UFVS 2002	25 ± 3,7	4 ± 1,0	TAN

(a)= média da contagem de lesões em 4 repetições; (b)= média da contagem de urédias em 30 lesões/genótipo; (c)= caracterização da reação dos genótipos.

3.4. Reação dos genótipos de feijão-comum ao isolado PPUFV01 de *P. pachyrhizi*.

A reação dos genótipos de feijão-comum foi similar à observada em guandu. No entanto, em nenhum genótipo de feijão-comum avaliado foi identificada a reação de imunidade. A reação tipo 4 nesses genótipos caracteriza-se pela presença de urédias com esporulação esparsa (Figura 5).

O período de incubação (PI) variou 9 a 11 dias. O período latente (PL) variou de 12 a 16 dias após a inoculação, sendo consistentes entre as repetições em cada genótipo. Os genótipos Pv 2, Pv 4, Pv 9 e Pv 10 não completaram o PL durante o período de avaliação que foi de 20 dias após a inoculação. O número médio de lesões/cm² variou de 3 a 20, sendo a avaliação realizada no primeiro trifólio aos 20 d.a.i (Tabela 7). O número médio de lesões/cm² variou de 3 nos genótipo Pv 9 e Pv 10 a 20 lesões/cm² nos genótipos Pv 6 e Pv 11. Com base no número médio de lesões/cm², os genótipos avaliados e a soja UFVS 2002 foram agrupados em 4 grupos, sendo que a soja UFVS 2002 ficou num grupo isolado, por apresentar maior frequência de infecção.

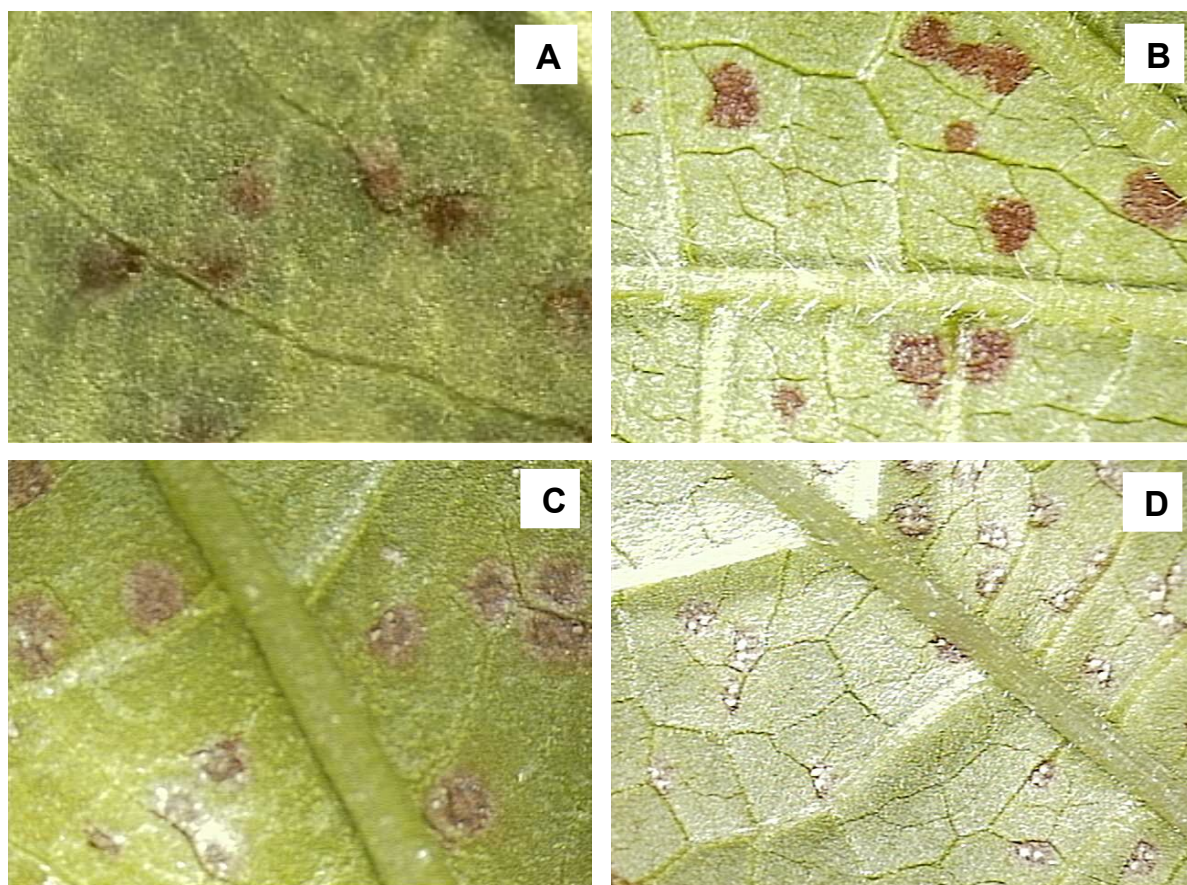


Figura 5. Reações identificadas nos genótipos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) em resposta a infecção por *P. pachyrhizi*. A = reação tipo 1; B = reação tipo 2; C = reação tipo 3 e D = reação tipo 4 (Fotografias feitas com máquina fotográfica digital).

Nesta interação nenhum genótipo foi imune a *P. pachyrhizi*. Três genótipos apresentaram a reação 1 (23%), 2 apresentaram a reação 2 (15%), 3 apresentaram a reação 3 (23%) e 5 genótipos apresentaram a reação 4 (38%). Visualmente, o genótipo Pv 8 apresentou intensa esporulação, bastante superior aos demais cultivares.

Tabela 7. Caracterização dos componentes de resistência ao isolado monopustular PPUFV01 de *P. pachyrhizi* em genótipos de feijão-comum por meio de avaliação visual, apresentando os valores das médias correspondentes a cada variável avaliada (\pm o desvio padrão).

Genótipo	PI (d.a.i)*	PL (d.a.i)*	Lesões/cm²	Reação
Pv 2	10	-	17 \pm 4,7	1
Pv 9	11	-	3 \pm 1,0	1
Pv 10	11	-	3 \pm 0,5	1
Pv 4	11	-	5 \pm 1,8	2
Pv 12	11	-	7 \pm 1,0	2
Pv 1	11	16	9 \pm 1,7	3
Pv 3	10	13	8 \pm 3,2	3
Pv 5	10	14	10 \pm 2,1	3
Pv 6	10	13	20 \pm 2,9	4
Pv 7	10	13	11 \pm 4,3	4
Pv 8	11	14	13 \pm 3,0	4
Pv 11	10	13	20 \pm 4,0	4
Pv 13	11	12	10 \pm 2,3	4
Soja UFVS 2002	6	9	24 \pm 2,6	TAN

*d.a.i = dias após a inoculação.

4. DISCUSSÃO

Na literatura, *V. unguiculata*, *C. cajan* e *P. vulgaris* são relatados como hospedeiros de *P. pachyrhizi*. Todavia, essas informações não são precisas e confiáveis, em função do procedimento de identificação da espécie de *Phakopsora*. Por exemplo, em agosto de 1976, Vakili e Bromfield relataram a ocorrência de *P. pachyrhizi* em plantas de soja (*Glycine max*), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão fava (*Phaseolus lunatus*), feijão-da-espanha (*Phaseolus coccineus*) e lab-lab (*Dolichos lablab*) naturalmente infectadas em Porto Rico. Uredósporos foram coletados dessas plantas e inoculados isoladamente em plantas de soja do cultivar Wayne, suscetível à ferrugem da soja. Lesões distintas foram vistas de 7 a 14 dias após a inoculação, sendo visualizadas urédias esporulantes na maioria das lesões. Não foi visualizada nenhuma diferença nos sintomas nas plantas inoculadas com uredósporos dos diferentes hospedeiros. As lesões foram caracteristicamente RB e apresentavam 1, 2 ou, muito raramente, 3 urédias. Durante toda a avaliação, a produção de uredósporos foi mínima. Sob as mesmas condições de casa de vegetação, isolados de *P. pachyrhizi* provenientes do continente asiático produziram lesões TAN com maior número de urédias e intensidade de esporulação. Mais de 30 cultivares comerciais de soja, plantados nos Estados Unidos foram inoculados com o isolado de Porto Rico e todos reagiram de modo semelhante ao cultivar Wayne. Posteriormente, Frederick et al. (2002) utilizando método de detecção e discriminação das duas espécies de *Phakopsora* baseado em PCR demonstraram que o isolado de Porto Rico pertencia à espécie *P. meibomia* e não à *P. pachyrhizi*. A identificação segura da espécie é fator importante para o estabelecimento da gama de hospedeiros. Neste trabalho, utilizou-se um isolado que comprovadamente pertence à

espécie *P. pachyrhizi* e condições padronizadas de inoculação. Assim, as diferenças fenotípicas observadas refletem variabilidade genética das espécies analisadas.

Apesar de todos os genótipos de feijão-caupi (*V. unguiculata*) avaliados neste trabalho terem sido resistentes ao isolado PPUFV01 de *P. pachyrhizi*, foram observados tipos distintos de reação ao patógeno nas folhas cotiledonares. Em dois genótipos foi constatada a presença de urédias vermelho escuras com pouca esporulação, similares às lesões RB em soja. Os diferentes tipos de reação observados podem refletir mecanismos de resistência em etapas distintas da patogênese. Por exemplo, imunidade tem sido associada à resistência pré-haustorial na interação *Medicago truncatula-Uromyces striatus* (Rubiales & Moral, 2004) e reações necróticas a respostas de defesa após a formação do primeiro haustório (Rubiales & Moral, 2004; Kemen et al., 2005). Assim, é importante efetuar a caracterização microscópica da interação para determinar se as reações 1, 2 e 3 refletem a colonização de um maior número de células. Aparentemente, nos genótipos Vu30 e Vu32, por exemplo, o fungo é capaz de estabelecer uma relação biotrófica por um período de tempo suficiente para suportar nutricionalmente um crescimento fúngico capaz de produzir urédias com uredósporos.

Em contraste com o caupi, o feijoeiro apresentou um grau maior de compatibilidade com *P. pachyrhizi*. Os sintomas foram observados em toda a planta inoculada e os genótipos mais suscetíveis apresentaram esporulação e, de modo geral, frequência de infecção menor do que a soja. Este resultado é similar ao obtido por Miles et al. (2007). Esses autores avaliaram a resistência a diferentes isolados de *P. pachyrhizi* em 16 cultivares de feijão-comum, contendo diferentes genes de resistência a *Uromyces appendiculatus*. Como um grupo, os cultivares avaliados foram resistentes, mas nenhum foi imune. Quando comparados à soja suscetível, os genótipos de feijoeiro foram similares em severidade, mas tiveram menor esporulação e a maioria apresentou lesões RB.

É notável a variabilidade de resistência observada no restrito número de genótipos de guandu avaliados, sendo identificados genótipos com grau de suscetibilidade igual ao da soja até genótipos imunes. Tal fato pode ser

indicativo de aparente co-evolução de *P. pachyrhizi* com *Cajanus cajan*. O fungo *P. pachyrhizi* é possivelmente originário da Austrália, onde ocorre naturalmente em leguminosas silvestres, e das 32 espécies de *Cajanus*, 13 são endêmicas dessa região (Karnswara Rao et al., 2003). Todavia, a única ferrugem relatada como tendo importância secundária em guandu é *Uredo cajani* (Echavez-Badel & Bosques-Veja, 1998). Assim, os mecanismos que levaram o surgimento e a manutenção dessa variabilidade de resistência em *Cajanus cajan* são desconhecidos. De qualquer forma, é interessante avaliar esses genótipos com isolados procedentes de diferentes regiões geográficas, para determinar o espectro da resistência. Caso se confirme que a resistência identificada em guandu é efetiva contra diferentes isolados do patógeno, essa espécie pode ser fonte interessante de genes de resistência para a soja, uma vez que o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes tem sido dificultado pela variabilidade genética do fungo e pela ausência de fontes de resistência de amplo espectro. Por exemplo, nenhum material com nível de resistência adequado foi identificado na triagem de 940 cultivares de soja e de 12.000 acessos do banco de germoplasma do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Hartman et al., 2005).

A transferência interespecífica ou mesmo intergenérica é possível desde que as espécies e gêneros sejam taxonomicamente relacionados (Tai et al., 1999). Os gêneros *Glycine*, *Vigna*, *Phaseolus* e *Cajanus* são filogeneticamente relacionados e membros da tribo Phaseolaceae, subfamília Papilionoidae (Choi et al., 2004a), tornando exequível esta transferência, uma vez que tem-se observado em outros patossistemas, que os genes R são capazes de manter a sua funcionalidade quando transferido para espécies relacionadas (Rommens et al., 1995; Tai et al., 1999). Esta possibilidade é reforçada pelo fato de análogos de genes de resistência de *C. cajan* serem filogeneticamente relacionado aos de *Glycine* (Hy et al., 2002, Choi et al., 2004b).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CECCON, G.; SAGRILO, E.; FERNANDES, F. M.; STAUT, L. A.; BACKES, C. F.; PEREIRA, M. G.; RAMOS, E. R. Rendimento e composição química de espécies em consórcio com milho safrinha e rendimento da soja em sucessão, em MS. **Embrapa**, 2007 (publicação online).

<http://www.cpa0.embrapa.br/Noticias/artigos/consorciomilhosufrina.PDF>

CHOI, H. K.; KIM, D.; UHM, T.; LIMPENS, E.; LIM, H. A sequence based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. **Genetics**, v.166, p.1463–1502, 2004a.

CHOI, H. K.; MUN, J. H.; KIM, D. J.; ZHU, H.; BAEK, J. M.; MUDGE, J.; ROE, B.; ELLIS, N.; DOYLE, J.; KISS, G. B.; YOUNG, N. D. COOK, D. R. Estimating genome conservation between crop and model legume species. **PNAS**, v.101, p.15289–15294, 2004b.

CHUNG, B. J.; PARK, C. S. Soybean rust in Korea. **Soybean Rust Newsletter**, n. 12, p.49-50, 1977.

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

DEL PONTE, E. M.; GODOY, C. V.; LI, X.; YANG, X. B. Predicting severity of soybean rust epidemics with empirical rainfall models. **Phytopathology**, v.96, n.7, p.797-803. 2006.

DESLANDES, J. A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causadas por *Phakopsora pachyrhizi* no estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.2, p.337-339, 1979.

DuPREEZ, E. D.; van RIJ, N. C.; LAWRENCE, K. F. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on dry beans in South Africa. **Plant Disease**, v.89, p.206, 2005

ECHAVEZ-BADEL, R; BOSQUES-VEGA, A. Reaction of new long-day pigeonpea genotypes to rust (*Uredo cajani*). **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.82, p.201-208, 1998.

FREDERICK, R.D., SYNDER, C.L., PETERSON, G.L., BONDE, R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi* and *Phakopsora meibomia*. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 217-227, 2002.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Plant Pathology**, v.43, p.9.1-9.23, 2005.

GODOY, R.; FUSHITA, A. T.; SOUZA, F. H. D. Caracterização de onze linhagens puras de guandu selecionadas em São Carlos, SP. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2206-2213, 2004.

GUIRRA, F. Combate ao fungo, safra junho/2007. **Documento 150_Publicação online:**

http://www.agrodefesa.gov.br/sanidadevegetal/Rep_Safra.pdf

HARMON, C. L. First report of *Phakopsora pachyrhizi* telia on kudzu in the United States. **Plant Disease**, v.89, p.774, 2005.

HARTMAN, G. L., MILES, M. R., & FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 89, p.664-666, 2005.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; AND HYMOWITZ, T. Sources of resistance to soybean rust in perennial *Glycine* species. **Plant Disease**, v.76, p. 396-399, 1992.

HEATH, M. C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annals of Botany**, v. 80, p. 713-720, 1997.

HY, Z.; CANNON, S. B.; YOUNG, N. D.; COOK, D. R. Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.15, p.529-539, 2002.

ISAKEIT, T. First report of rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and kudzu in Texas. 2006

KEMEN, E.; KEMEN, A. C.; RAFIQI, M.; HEMPEL, U.; MENDGEN, K.; HAHN, M.; VOEGELE, R. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.18, p.1130–1130, 2005.

KILLGORE, E.; HEU, R.; GARDNER, D. E. First report of soybean rust in Hawaii. **Plant Disease**, v.78, p.1216, 1994.

KOCHMAN, J. K. Soybean rust in Australia. **Soybean Rust Newsletter**, n. 12, p.44-48, 1977.

KOENNING, S. R.; FRYE, J. W.; BUTLER, S. C.; CRESWELL, T. C. First report of *Phakopsora pachyrhizi* on kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*) in North Carolina and increased incidence of soybean rust on soybean in 2006. **Plant Disease**, v.91, p.637, 2007.

LYNCH, T. N.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; HARMON, P. F.; HAMON, C. L.; MILES, M. R.; HARTMAN, G. L. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* spp. In the United States. **Plant Disease**, v.90, p.970, 2006.

MENDGEN, K.; HAHN. M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, v.7, n.8, p.352-356, 2002.

MILES, M. R., FREDERICK, R. D. HARTMAN, G. L. Soybean Rust: Is the U.S. Soybean Crop At Risk?. <http://www.apsnet.org/online/feature/rust/>. 2003

MILES, M. R.; PASTOR-CORRALES, M. A.; HARTMAN, G. L.; FREDERICK, R. D. Differential response of common bean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant disease**, v.91, n.6, p.698-704, 2007.

MOREL, W. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, cause of soybean rust, on *Neonotonia wightii* in Paraguay. **Plant Disease**, v.91, p.325, 2006

NÜRNBERGER, T. Signal perception in plant pathogen defense. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n.55, p.167-182, 1999.

PAN, Z.; YANG, X. B.; PIVONIA, S.; XUE, L.; PASKEN, R.; ROADS, J. Long-term prediction of soybean rust entry into the continental United States. **Plant Disease**, v.90, n.7, p.840-846. 2006

PIVONIA, S.; YANG, X. B. Assessment of the potential year-round establishment of soybean rust throughout the world. **Plant Disease**, vol. 88, p. 523-529, 2004.

PRECCOTT, A.; MARTIN C. Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.4, p. 219, 1987.

PROVAZI, M.; CAMARGO, L. H. G.; SANTOS, P. M.; GODOY, R. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.328-334, 2007.

PUNJA, Z. K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens—a review of progress and future prospects. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.23, p.216–235, 2001.

ROMMENS, C. M. T.; SALMERON, J. M.; OLDROYD, G. E. D.; STASKAWICZ, B. J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. **The Plant Cell**, v. 7, p.1537-1544, 1995.

RUBIALES, D.; MORAL, A. Prehaustorial Resistance against Alfalfa Rust (*Uromyces striatus*) in *Medicago truncatula*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.239–243, 2004.

RYTTER, J. L.; RYTTER, W. M.; DOWLER AND K.R. BROMFIELD. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease**, v.68 p. 818–819, 1984.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.132, n.2, p.339-342, 1991.

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. **Plant Disease**, v.89, p.774, 2005.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: Hartman, G.L., Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (Eds.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society. p.25-26, 1999.

TAI, T. H.; DAHLBECK, D. K.; CLARK, E. T.; GAJIWALA, P.; PASION, R.; WHALEN, M. C.; STALL, R. E. STASKAWICZ, B. J. Expression of the *Bs2* pepper **gene** confers resistance to bacterial spot disease in tomato. **PNAS**, v.96, p.14153-14158, 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGENS, D.G.; GIBSON, T. J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, n.22, p.4673-4680, 1994.

VAKILI, N. G.; BROMFIELD, K. R. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes en Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**, v.60, p.995-999, 1976.

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

YANG, X. B.; TSCHANZ, A. T.; DOWLER, W. M.; WANG, T. C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, 81:1420-1426. 1991.

YEH, C. C.; SINCLAIR, J. B.; TSCHANZ, A. T. *Phakopsora pachyrhizi*: Uredial development, uredospore production and factors affecting teliospore formation on soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.33, p.25-31, 1982.

YEH, C. C.; TSCHANZ, A. T.; SINCLAIR, J. B. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and others hosts. **Phytopathology**, v.71, p.1111-1112, 1981.

YORINORI, J. T., YORINORI, M.A. & GODOY, C. V. Seleção de cultivares de soja resistentes à ferrugem “asiática” (*Phakopsora pachyrhizi*). **Anais, XXX Reunião Sul de Soja da Região Sul**. Cuz Alta, RS. p.94, 2002.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE FILHO, G.R.; NEVES, M.C.P.; Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solo do cerrado do estado do Piauí. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, dez. 2000. 23p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 125).

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INTERAÇÃO SOJA UFVS 2002 - *PHAKOPSORA PACHYRHIZI*

RESUMO

NOGUEIRA, Sônia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Identificação de genes diferencialmente expressos na interação soja UFVS 2002 - *Phakopsora pachyrhizi***. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Fabrício de Ávila Rodrigues

Mudanças no padrão de expressão de genes no patógeno e na planta hospedeira são fatores determinantes do fenótipo das interações planta-patógeno. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi identificar genes expressos durante a interação soja x *P. pachyrhizi*, por meio da utilização da técnica de hibridização subtrativa por supressão. Bibliotecas subtrativas foram construídas a partir de mRNA isolado de folhas coletadas aos 2 e 9 dias após a inoculação, momento de formação dos haustórios e abertura das urédias e liberação dos uredósporos, respectivamente. Foram identificadas 439 ESTs, sendo 21% envolvidas na defesa contra patógenos, 11% em resposta a estresses, 8% envolvidas em transcrição e 3% em transdução de sinais. Ainda, 31% das ESTs apresentaram similaridade a genes com função desconhecida e 26% a genes envolvidos em metabolismo basal. Foram desenhados 25 pares de oligonucleotídeos, representando 25 genes, para a análise da expressão gênica por RT-qPCR. Genes que codificam proteínas envolvidas em resposta de defesa como PR1, PR4, thioredoxina, R14, quitinase 1 e catalase, entre outros, foram induzidos pelo patógeno. A maioria apresentou dois picos de expressão, o primeiro entre 12 e 24 h após a inoculação e o segundo 8 dias

após a inoculação. Estudos funcionais deverão ser efetuados para confirmar e quantificar o papel de cada um desses genes na interação.

CHAPTER 2

IDENTIFICATION OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN THE UFVS 2002 SOYBEAN- *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* INTERACTION.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Sônia Regina, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007. **Identification of genes differentially expressed in the UFVS 2002 soybean- *Phakopsora pachyrhizi* interaction.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Fabrício de Ávila Rodrigues

Transcriptional changes that occur in the pathogen and in the host plant are determinants of the phenotype of host-pathogen interactions. This work aimed to identify genes differentially expressed during soybean x. *P pachyrhizi* interaction by using the subtractive suppressive hybridization technique. The subtractive libraries were built from mRNA isolated from leaves collected at the second and ninth day after inoculation; 439 ESTs from these libraries were characterized, with 21% being involved in the defense against pathogens, 11% involved in response to stresses, 8% in transcription and 3% in signal transduction. Also, 31% of the ESTs presented similarity with genes with unknown function and 26% with genes involved in basal metabolism. Twenty-five pairs of oligonucleotides were designed, representing 25 genes for genic expression analyses by RT-qPCR. Genes that codes for proteins involved in defense response such as PR1, PR4, thioredoxin, R14, quitinase 1 and catalase, were induced by the pathogen. Most genes presented two expression peaks; the first between 12 and 24 h after inoculation and the second 8 days after inoculation. Functional studies must be carried out to confirm and quantify the role of these genes in the interaction.

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem asiática é uma doença políciclica e sua importância tem aumentado nos últimos anos em função de sua introdução nas principais áreas de cultivo da soja no mundo e pela falta de variedades resistentes (Hartman et al. 1991; Hartman et al. 1992; Hartman et al., 2005; e Guirra, 2007). Na América do Sul, a doença causa prejuízos que comprometem a rentabilidade dos produtores e a economia dos países onde a soja possui destaque dentro do agronegócio, como é o caso do Brasil, segundo maior produtor mundial de soja (Yorinori et al., 2005; Pessoa, 2007).

A obtenção de cultivares de soja resistentes à ferrugem asiática tem sido um desafio para pesquisa. Quatro genes de resistência dominantes já foram identificados (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4*) (Bromfield 1981; Hartwig 1986). No entanto, já existem relatos de raças capazes de suplantá-los, o que indica a utilização de resistência monogênica para o controle da ferrugem da soja tem importância limitada (Hartman et al., 2005). Como alternativa, os programas de melhoramento genético têm procurado desenvolver variedades que apresentem resistência parcial, também denominada *slow rusting*. Genótipos com esse tipo de resistência podem demandar um número menor de aplicação de fungicidas durante a estação de cultivo para o controle da ferrugem, que é atualmente o principal método de controle da doença. Em alguns países foram identificados cultivares tolerantes, ou seja, que apresentam uma redução no amarelecimento e desfolha causada pela ferrugem da soja (Hartman et al., 2005).

O desenvolvimento de variedades transgênicas resistentes pode ser uma para o controle da ferrugem asiática da soja. Em geral, a resistência de

plantas a doenças é caracterizada pela ativação de respostas de defesa em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares específicos ou moléculas efetoras produzidas por patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 1997; Feys & Parker, 2000, Schenk et al., 2000). Por outro lado, os fitopatógenos são capazes de inibir as respostas de defesa da planta, de forma a assegurar o sucesso do processo infeccioso.

Por meio da superexpressão de genes de defesa é possível desacoplar a resposta de defesa do reconhecimento do patógeno, aumentando o nível de resistência. Por exemplo, plantas transgênicas de trigo superexpressando o gene da quitinase II exibiram maior resistência a oídio (Oldach, et al., 2001). Plantas transgênicas de trigo superexpressando o gene NPR1 de *Arabidopsis*, um gene que regula respostas de defesa, exibiram altos níveis de resistência a *Fusarium graminearum* (Makandar et al., 2006). Também em trigo Mackintosh et al. (2007) relataram que a superexpressão dos genes de resposta de defesa como β -1,3-glucanase aumentou a resistência das plantas a *Fusarium graminearum*.

Existe uma crescente disponibilidade de dados de genomas de sistemas modelos. Isto contribui para o melhor entendimento dos eventos associados à resistência de plantas a patógenos e à fisiologia do parasitismo. No entanto, a maioria dos estudos foi conduzida com interações incompatíveis. Recentemente os estudos voltaram-se para a análise de interações compatíveis. Os poucos estudos realizados demonstram similaridade nos mecanismos de resposta de plantas suscetíveis e resistentes a fitopatógenos. Um fator determinante no fenótipo da interação parece ser o tempo e a magnitude da resposta. Estes processos são dependentes da espécie da planta e do elicitor das respostas de defesa (Desenber et al., 2007).

Na interação compatível entre fumo e *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* houve um atraso substancial na produção de H₂O₂ após a infecção das folhas, o que sugere a morte celular ser suprimida por patógenos virulentos, permitindo o avanço da doença (Mur et al., 2005). O acúmulo de transcritos de lipoxigenase em folhas de batata após a infecção com *Phytophthora infestans* foi mais tardia e mais fraca em interações compatíveis (Kolomiets et al., 2000). Rinaldi et al. (2007) estudaram o perfil de expressão de genes em folhas de

Populus em resposta à infecção por *Melampsora larici-populina* e verificaram que poucos genes tiveram sua expressão alterada em interações compatíveis, o que indica um atraso na resposta de defesa nessa interação.

A indução da via bioquímica de resposta a um patógeno em particular, requer a indução ou a supressão de genes tanto no hospedeiro quanto no patógeno. O 'transcriptoma' da interação é portanto, a soma dos genes transcritos, de ambas as partes, durante a associação (Ayliffe et al. 2002; Glazebrook, 2005). A compreensão do transcriptoma da interação pode conduzir à identificação de passos bioquímicos ou vias de sinalização que podem ser manipuladas visando à obtenção de resistência durável.

O transcriptoma de diversas interações planta-patógeno tem sido caracterizado por técnicas como a análise de etiquetas de genes expressos (ESTs) (Xiong et al., 2001; Kong et al., 2005; Bernardo et al., 2007; Leal Jr et al., 2007; Rinaldi et al., 2007), de macro e microarranjos de DNA (Cheong et al., 2002; Torregrosa et al., 2004; Moy et al., 2004; Foster-Hartnett et al., 2007) e análise de expressão diferencial de genes baseadas em PCR (Matthias & Mendgen, 2001). A maioria desses métodos favorece a identificação de genes com altos níveis de expressão, não sendo capazes de detectar transcritos com baixo nível de expressão, além de exigir a disponibilidade de equipamentos caros e específicos.

Uma metodologia alternativa para o isolamento de genes diferencialmente expressos foi desenvolvida por Diatchenko et al. (1996). Esse método, denominado hibridização subtrativa por supressão ("Suppressive Subtractive Hybridization", SSH), combina a normalização de genes com diferentes níveis de expressão com a subtração em apenas uma etapa. É realizada ainda uma etapa de PCR que suprime a amplificação de cDNAs correspondentes a transcritos muito abundantes e favorece a amplificação dos cDNAs correspondentes a transcritos normalizados e com expressão diferencial. Com isso, a SSH permite a construção de bibliotecas enriquecidas para genes diferencialmente expressos. Aliado a descoberta de genes, o estudo da expressão diferencial é útil para o entendimento dos mecanismos de resposta de defesa em plantas e de patogênese em fitopatógenos.

Essa técnica vêm sendo utilizada com sucesso na identificação de genes diferencialmente expressos em vários patossistemas. Xiong et al. (2001) utilizaram a hibridização subtrativa por supressão para identificar um grande número de transcritos raros que são induzidos por ácido jasmônico, BTH ou pelo fungo *Pyricularia grisea* em plantas de arroz. Tian et al. (2003) utilizaram a SSH com o objetivo de identificar genes envolvidos na resistência horizontal de batata a *P. infestans*. Estes autores isolaram genes relacionados à patogênese e defesa em cultivares suscetíveis. Schueuermann (2006), utilizando a mesma técnica identificou vários genes de tomateiro induzidos pela infecção por *Alternaria solani*. Para ferrugens, Fernandez et al. (2004) usaram SSH com o objetivo de isolar genes de café envolvidos na resistência à ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, nos estádios iniciais de indução da resposta de hipersensibilidade. Foram anotadas 402 ESTs, sendo que no mínimo 13% destas representaram genes envolvidos na resposta de defesa e outros 13% nos processos de sinalização

Diante do exposto e considerando-se que o transcrito da interação soja - *P. pachyrhizi* ainda não foi completamente caracterizado, este trabalho teve por objetivo identificar genes diferencialmente expressos nessa interação, por meio da utilização da técnica de hibridização subtrativa por supressão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo das plantas e inoculação.

Sementes do cultivar de soja UFVS 2002, suscetível à ferrugem asiática, foram semeadas em vasos plásticos contendo solo misturado a areia e esterco na proporção 3:1:1, previamente tratado com brometo de metila. Aos 30 dias após a semeadura as plantas foram inoculadas com uma suspensão de 10^5 uredósporos.mL⁻¹, quando apresentavam três trifólios totalmente expandidos, e mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C, no escuro, durante 24 h. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação.

Nas inoculações foi utilizado o isolado monopustular PPUFV01. O isolado foi obtido a partir de uredósporos presentes em folhas de soja com sintomas de ferrugem asiática coletadas em 2004, no Campo Experimental da Agronomia, Campus da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. Os uredósporos desse isolado foram coletados, armazenados a -80 °C e posteriormente multiplicados em soja cv. UFVS 2002, em condições de casa de vegetação. As plantas-testemunhas foram atomizadas somente com água.

2.2. Construções das bibliotecas subtrativas.

Para as extrações de RNA e construção das bibliotecas, foram coletados o segundo e terceiro trifólios de 6 plantas por tratamento (inoculado e testemunha), nos tempos 0, 12 horas após a inoculação (h.a.i) e 1, 2, 4, 6, 8 e 9 dias após a inoculação (d.a.i). As amostras de tecido foram imediatamente

congeladas em nitrogênio líquido e, a seguir, armazenadas a -80 °C até posterior processamento.

A extração de RNA total foi efetuada segundo metodologia descrita por Preccot & Martin (1987), com algumas modificações. Para o isolamento do RNA, o tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; LiCl 100 mM, SDS 1%. A seguir, foram realizadas duas extrações com fenol:clorofórmio (1:1, v/v). O RNA foi precipitado com 0,25 volume de LiCl 10 M a 4 °C *overnight*. Após centrifugação (12000 rpm/1 h a 4 °C), o RNA foi ressuspendido em acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e foi feita nova precipitação com etanol absoluto 0,8 volume. O RNA foi mantido a -20 °C *overnight*. Após centrifugação (12000 rpm/1 h a 4 °C), o RNA foi lavado com etanol 75% e ressuspendido em água tratada com DEPC 0,1% e armazenado a -80 °C até o momento do uso.

Para a construção das bibliotecas, o RNA mensageiro foi purificado a partir de 500 µg de RNA total conforme o protocolo do kit *NucleoTrap Nucleic Acid Purification* (Clontech, Palo Alto, CA, EUA), liofilizado e ressuspendido em Tris-HCl 5 mM, pH 7,5 e armazenado a -80°C até o momento do uso. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante e quantificado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, conforme protocolo do kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

As bibliotecas foram construídas de acordo com o protocolo do kit *PCR-Select™ cDNA Subtraction* (Clontech, Palo Alto, CA, EUA). Para a construção de bibliotecas subtrativas enriquecidas para genes induzidos durante a infecção foi utilizado como RNA '*tester*' aquele oriundo de trifólios inoculados e como '*driver*' o RNA oriundo de trifólios atomizados com água e coletados no mesmo tempo.

Os cDNAs resultantes da subtração foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em células de *Escherichia coli* EC100 (Epicentre, Madison, WI, EUA), por meio de eletroporação. As colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram identificadas por meio da amplificação dos insertos por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R e análise do produto de amplificação em gel de agarose 1 %. Clones

contendo insertos de diferentes tamanhos foram selecionados e transferidos para placas de 96 cavidades contendo meio *Freeze media* (Budimann, 2000) e ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), incubadas a 37°C por 16 h e estocados a -80°C .

2.3. Seqüenciamento e análise das bibliotecas.

A extração do DNA plasmidial foi realizada repicando-se as colônias para placas de microcultura contendo 1 mL de meio Circle Grow acrescido de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h a 280 rpm. Após esse período, as mesmas foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em $240 \mu\text{L}$ de solução G.E.T pH 7,4 (EDTA pH 8,0 0,5 M, Tris-HCl 1 M, Glicose 20%) e centrifugadas a 3000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em $80 \mu\text{L}$ de solução G.E.T contendo RNase ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e agitadas por 2 min. Uma alíquota de $60 \mu\text{L}$ da suspensão de células foi transferida para placas de polipropileno e adicionado a cada poço $80 \mu\text{L}$ de NaOH 0,2 N e SDS 1% (1:1), homogeneizadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, centrifugou-se as placas a 3700 rpm por 2 min, fez-se a adição de $80 \mu\text{L}$ de KOAc 3 M pH 4,8, homogeneizou-se por inversão e incubou-se no gelo por 10 min. As placas foram então incubadas em estufa a 90°C por 30 min, novamente no gelo por 10 min e centrifugadas a 3700 rpm por 9 min. Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante foi filtrado em uma placa Millipore (MAGV N22) por meio de centrifugação (3000 rpm por 6 min). Por fim, foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 3700 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA plasmidial lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisados em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos ou produtos da PCR dos clones recombinantes foram seqüenciados no equipamento MegaBACE 500 (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação foram M13F e

M13R. Para a reação de sequenciamento foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos M13F e/ou M13R. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados nestas reações 100 a 150 ng de DNA plasmidial, 0,5 μM do oligonucleotídeo M13F ou M13R, 2,0 μL de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pré-mix em volume final de 5 μL. As condições da PCR foram 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 2 minutos repetidas 35 vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 μL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 minutos a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 minutos a 3700 rpm. O DNA foi então lavado com 100 μL de etanol 70%, centrifugado a 3700 rpm por 10 minutos e deixado secar por 10 minutos. Após a precipitação, o DNA foi ressuspendido em 5 μL de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em sequenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

As seqüências obtidas foram agrupadas com a utilização do programa CAP3. Os contíguos e singletons foram comparados com seqüências depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (algoritmo BLASTx), *The Institute of Genomic Research* (TIGR) (algoritmo BLASTn) (<http://www.tigr.org/>). Para definir as categorias funcionais em potencial dos genes encontrados foram utilizadas as ferramentas disponíveis nos bancos de dados *Expert Protein Analysis System* (ExPASy) (<http://bo.expasy.org/>) e InterPRO (<http://www2.ebi.ac.uk/interpro/>). A similaridade foi considerada significativa quando o valor esperado (*e-value*) foi menor do que $1e^{-3}$.

2.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR).

As extrações de RNA para análise da expressão gênica por RT-qPCR foram realizadas a partir de plantas inoculadas com o isolado monopustular

PPUFV01 ou atomizadas com água, em um ensaio independente do utilizado para a construção das bibliotecas subtrativas, conforme descrito no item 2.2. A integridade do RNA obtido foi determinada por análise eletroforética em gel de agarose 1,2% desnaturante e a quantidade determinada por meio de leituras em espectrofotômetro.

Cerca de 100 µg de RNA total de cada amostra foi tratado com DNase I livre de RNase e purificado em colunas do kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A ausência de contaminação por DNA genômico foi comprovada por meio de PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 500 pb do gene da Actina de soja (acesso NCBI ATSY1). Os cDNAs foram sintetizados conforme o protocolo do kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), a partir de 5 µg de RNA total utilizando oligo-dT. A síntese foi confirmada por meio de PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos usados para verificar a eficácia do tratamento do RNA total com DNase I.

Para análise da expressão diferencial por PCR em tempo real, foram desenhados pares de oligonucleotídeos a partir da seqüência consenso dos contíguos de ESTs ou unigenes, utilizando o programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems), tendo como meta amplicons em torno de 70 pb. Foram avaliados como genes-controle, foram avaliados os genes que codificam Actina 1, α -Tubulina, β -Tubulina, Glutamina Sintase, Proteína Ribossomal S21 e Proteína Ribossomal L2 (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão de genes empregados como controles endógenos na análise de expressão dos genes alvo por RT-qPCR. N°. NCBI = Número de Acesso (NCBI) da seqüência utilizada como referência.

Oligonucleotídeos	Seqüência (5'→3')	N°. NCBI	Descrição
GLMX_CT_001 F	ACTATTGGCGCTGAGCGTTT	J01298	Actina 1
GLMX_CT_001 R	TGCCTGATGCTTCCATTCCCT		
GLMX_CT_002 F	CACCAACCTCAACAGGCTCAT	AY907702.1	α-Tubulina
GLMX_CT_002 R	TGGCACCATCGAACCTCAA		
GLMX_CT_003 F	TGAGGAAACTGGCCGTGAA	AY907703	β-Tubulina
GLMX_CT_003 R	GCGCAAATCCAACCATGAA		
GLMX_CT_004 F	GGCAACGAACGTCGTTTG	L20248	Glutamina Sintase
GLMX_CT_004 R	TTGCAACACCCCATACAAAGG		
GLMX_CT_005 F	AGCGGAGACGGTTCTTCG	AW317508	Proteína Ribossomal S21
GLMX_CT_005 R	GCTCTTACGCTTGGCAGCTT		
GLMX_CT_006 F	CCGCTACAAGAAGCAGAACGA	CAC20221	Proteína Ribossomal L2
GLMX_CT_006 R	TAGATGAACTGGCCGGTGTAG		

Estes genes foram comparados quanto à cinética de expressão utilizando como calibrador o cDNA da amostra controle coletada a zero hora, e como controle endógeno cada um dos genes controles pré-selecionados, alternadamente, a fim de verificar possíveis variações no nível de expressão dos genes em função do gene utilizado como controle endógeno. Em função da possibilidade de existência de diferenças na eficiência de amplificação (E) entre os oligonucleotídeos de genes utilizados como controle endógeno e aqueles destinados aos genes alvo, foi determinada a eficiência de amplificação de cada um dos pares dos oligonucleotídeos utilizados.

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume final das reações foi de 10 µL, contendo 5 µL de 2x SYBR® Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de cada oligonucleotídeo e 0,25 µL de cDNA (correspondendo a 25 ng de RNA total submetido à síntese de cDNA), sendo todas as reações realizadas em triplicata. As condições de termociclagem

utilizadas foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $(1+E_E)^{Ct E_{am} - Ct E_{cal}} \times (1+E_A)^{Ct A_{cal} - Ct A_{am}}$, onde: E_E , eficiência de amplificação do gene endógeno; E_A , eficiência de amplificação do gene alvo; CtE_{am} , valor de Ct do gene endógeno na amostra; CtE_{cal} , valor de Ct do gene endógeno no calibrador; CtA_{cal} , valor de Ct do gene alvo no calibrador; e CtA_{am} , valor de Ct do gene alvo na amostra. Essa equação é derivada da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification Getting Started Guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem), considerando as eficiências de amplificação do gene endógeno e do gene alvo. A eficiência foi estimada utilizando diluições do cDNA molde e a equação $(1+E) = 10^{(-1/slope)}$. A presença de produto de amplificação não específica foi verificada pela curva de dissociação e corrida em gel de agarose 3,5%. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um amplicon, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas, sendo visualizados como presença de mais de um pico de dissociação.

No segundo ensaio para a confirmação da expressão diferencial dos genes selecionados, plantas de soja da cultivar UFVS-2002 foram inoculadas com o isolado PPUFV01 no momento em que apresentavam três trifólios expandidos. Foram coletados o primeiro e segundo trifólios de 6 plantas/tempo. As coletas foram feitas 0, 6, 12, 24 e 36 h.a.i e também aos 2 e 8 d.a.i. O RNA extraído da amostra zero hora das plantas não inoculadas foi utilizado como calibrador.

3. RESULTADOS

3.1. Construções das bibliotecas subtrativas.

Foram construídas bibliotecas enriquecidas para transcritos induzidos durante a interação compatível, aos 2 (biblioteca GLMX-PS-002) e 9 d.a.i (biblioteca GLMX-PS-001). A análise do tamanho dos insertos da biblioteca GLMX-PS-002 por PCR, revelou que os clones dessa biblioteca apresentaram baixa variabilidade no tamanho dos insertos, indicando uma redundância de clones. Assim, para assegurar uma maior variabilidade de clones a serem submetidos ao seqüenciamento selecionaram-se 96 clones a partir do resultado da PCR de clones estocados em oito placas.

Os clones da biblioteca GLMX-PS-001 apresentaram maior diversidade de insertos (Figura 2), sendo submetidos ao seqüenciamento 480 clones dessa biblioteca.

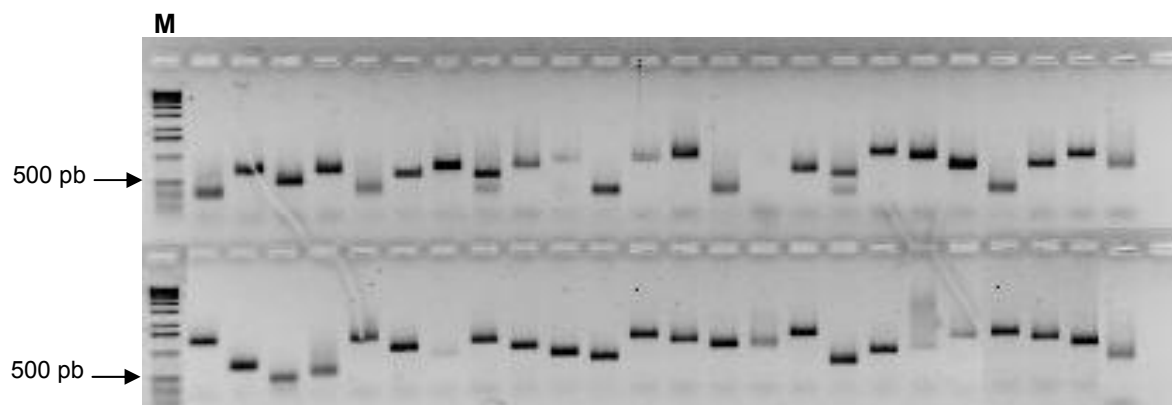


Figura 2. Análise do tamanho dos insertos dos clones da biblioteca GLMX-PS-001, por meio da amplificação dos insertos por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos M13F e M13R. Os produtos da PCR de colônia foram analisados em gel de agarose 1%. M= marcador 1 kb leader.

3.2. Análise da biblioteca enriquecida para genes diferencialmente expressos aos dois dias após a inoculação e classificação dos ESTs.

Foram seqüenciados 96 clones da biblioteca GLMX-PS-002, sendo obtidas 79 ESTs com tamanho médio de 410 pb. Apesar da pré-seleção para clones de insertos diferentes (conforme item 3.1), essa biblioteca apresentou baixa variabilidade de ESTs. Vinte e nove ESTs (37%) apresentaram similaridade a genes ainda não caracterizados, três clones similares aos genes que codificam para uma ribonucleoproteína e um fator de transcrição em arroz representaram 28% da biblioteca. Entre as ESTs com similaridade a genes de resposta de defesa, foi encontrado um contiguo com similaridade ao gene da catalase ($1e-94$, 3 ESTs) em soja, um EST com similaridade ao gene que codifica chalcone isomerase ($1e-35$) e 5 ESTs com similaridade ao gene que codifica uma proteína rica em glicina ($7,6e-25$) envolvida no fortalecimento da parede celular.

Foram identificados ainda ESTs com similaridade a genes encontrados em uma biblioteca subtrativa de soja infectada com *Fusarium solani* f.sp. *glycines* ($7,3e-32$) e 2 ESTs com similaridade a genes de outra biblioteca subtrativa de soja construída a partir de mRNA isolado de raízes, 24 h.a.i com *Bradyrhizobium japonicum* ($2,7e-7$), genes provavelmente envolvidos na interação e que ainda não foram caracterizados. Foram identificados 11 ESTs com similaridade ao fator de transcrição OSJNBa ($1,7e-62$), 2 ESTs com similaridade ao gene que codifica uma proteína difusora de cátions ($6,2e-62$), genes que codificam componentes da membrana envolvidos em transporte celular e proteínas envolvidas na fotossíntese. Sete ESTs foram similares a seqüência de uma transposase ($6,6e-145$). Duas ESTs foram similares ao gene que codifica uma gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase ($9,1e-42$).

Além destas, foram identificadas ESTs com similaridade a genes que codificam proteínas com função desconhecida (Tabela 2). Após o agrupamento

dessas seqüências no programa CAP3 e comparação com seqüências depositadas nos bancos de dados NCBI e TIGR foram identificados 18 genes únicos, que incluem genes envolvidos em resposta de defesa de plantas a patógenos, de genes que codificam fatores de transcrição, genes do metabolismo básico e genes ainda não caracterizados.

Tabela 2. Anotação Funcional de Genes identificados na biblioteca subtrativa da interação soja x *P. pachyrhizi* enriquecida para genes diferencialmente expressos aos 2 dias após a inoculação.

Contíguo	Anotação da função	Provável função	Valor e	Acesso	Nº ESTs
I. Resposta de defesa					
CGLMX237	Catalase (<i>G. max</i>).	Metabolismo de H ₂ O ₂ , transdução de sinais e resposta a estresses oxidativos.	1,00E-94	TC227693	3
GLMX2E01	Chalcone isomerase (<i>G. max</i>).	Síntese de flavonóides, fitoalexinas e compostos da parede celular.	1,00E-35	TC205536	1
CGLMX236	Proteína rica em glicina (<i>A. thaliana</i>).	Componentes da parede celular.	7,60E-25	TC230423	5
GLMX2A24	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (<i>Artemisia annua</i>).	Síntese de precursor de isoprenoides (fotossíntese e defesa de plantas a patógenos)	8,10E-03	TC204482	1
CGLMX212	Fotossistema I, subunidade IV (<i>Spinacia oleracea</i>).	Proteína que Interage com ferredoxina e ferredoxina oxiredutase no fotossistema I.	6,60E-67	TC224562	2
II. Transporte					
CGLMX206	Facilitador de difusão de cátion 9 (<i>Stylosantes hamata</i>).	Componente da membrana celular, atua no transporte de cátions.	6,20E-62	TC224644	2
III. Transcrição					
CGLMX223	OSJNBa0086O06.23 (<i>O. sativa</i>).	Fator de transcrição.	1,70E-62	TC204473	11
CGLMX210	Ribonucleoproteína_polipeptideo E (<i>O. sativa</i>).	Processamento de RNA e <i>splicing</i> .	1,90E-94	TC225733	11

Continua...

Tabela 2. (Continuação)

Contíguo	Anotação da função	Provável função	Valor e	Acesso	Nº ESTs
IV. Metabolismo					
GLMX2B06	At2g03810 (<i>A. thaliana</i>).	Proteína pré-ribossomal 18S.	5,90E-62	AW351149	1
V. Transposição					
CGLMX226	Transposase (<i>Bacillus subtilis</i>).	Envolvida na transposição de segmentos de DNA.	6,60E-145	TC225358	7
VI. Fotossíntese					
CGLMX208	Gliceroaldeído-3-fosfato deidrogenase B (<i>P. sativum</i>).	Atua no ciclo pentose-fosfato e glicólise.	9,10E-42	TC203876	2
VII. Desconhecida					
GLMX2D05	sao54a05.y1 clone de biblioteca SSH a partir de raízes infectadas com <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>glycines</i> .	Desconhecida	6,10E-01	BQ299030	1
CGLMX207	EST de uma biblioteca subtrativa de raízes de soja tratadas com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> por 24 horas.	Desconhecida	2,70E-07	CF922568	2

Continua...

Tabela 2. (Final)

Contíguo	Anotação da função	Provável função	Valor e	Acesso	Nº ESTs
VII. Desconhecida (Cont.)					
CGLMX2H06	FiS1D5-“Forrest infected Subtraction Library” (<i>G. max</i>) EST de Biblioteca SSH a partir de mRNA isolado de raízes infectadas com <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> .	Desconhecida	7,30E-32	BI245411	2
CGLMX205	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	6,40E-23	TC218120	2
CGLMX209	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	4,60E-123	TC217710	23
GLMX2A06	Gene puativo no clone TAC:K14A17 (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	3,60E-08	TC229416	1
CGLMX201	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	1,40E-90	BF426105	2

3.3. Análise da biblioteca subtrativa enriquecida para genes diferencialmente expressos aos 9 dias após a inoculação e classificação dos ESTs

Foram seqüenciados 480 clones, sendo obtidas 360 ESTs com tamanho médio de 470 pb. A análise de similaridade das seqüências dessa biblioteca foi feita da mesma maneira da biblioteca obtida aos 2 d.a.i. Com o alinhamento das seqüências no programa CAP3 foi possível identificar 51 genes potenciais únicos.

Entre os contiguos representando genes relacionados à defesa com maior número de ESTs estão aqueles com similaridade ao gene que codifica PR4 (20 ESTs), uma proteína relacionada a patogênese com atividade de quitinase (Graham et al., 2003). O contiguo CGLMX121 (19 ESTs) apresentou similaridade ao gene CTV.15 de *Poncirus trifoliata* que está localizado em uma região genômica envolvida na resistência ao vírus da tristeza. O unigene CGLMX132 (6 ESTs) foi similar ao gene que codifica uma proteína rica em glicina componente da parede celular e envolvida na resposta de defesa a patógenos. Outro contiguo (2 ESTs) foi similar ao gene R14, relacionado à defesa e membro de uma família multigênica de genes de resistência em soja. O contiguo CGLMX131 foi similar ao gene NtPRp27 (2 ESTs), uma proteína relacionada à patogênese. O clone GLMX1H02 corresponde ao gene da tioredoxina peroxidase 1 e o clone GLMX1E01 corresponde ao gene da peroxiredoxina, ambos envolvidos na regulação de H₂O₂ na célula vegetal.

Foram identificados ESTs com similaridade a genes envolvidos em resposta a estresses. Entre esses, os contiguos com maior número de ESTs foi similar ao gene de uma heme oxigenase (26 ESTs) envolvida em resposta a estresses oxidativos, SRC1 (12 ESTs) de resposta a desidratação, RD22 que é responsivo a estresses hídricos e também a patógenos (7 ESTs) e o gene de uma chaperona (*heat Shock protein*, 3 ESTs). Os contiguos com similaridade ao fator de transcrição BHLH que regula a transcrição em resposta a estresse e

gene de uma possível calmodulina, envolvida em transdução de sinais foram representados por 12 ESTs cada um. Foram identificados ESTs com similaridade a genes envolvidos em transporte de membrana celular entre esses um contiguo similar ao gene que codifica alantoina permease (2 ESTs) envolvida em transporte de nitrogênio, outro similar a um gene que codifica a proteína hipotética Ta0149 e o contiguo com similaridade ao gene da proteína hipotética F11F8_10 (17 ESTs) que está envolvida na eliminação de substâncias tóxicas da célula. O clone GLMX1F07 apresentou similaridade ($1,1e-61$) com o gene que codifica um transportador ABC, também envolvido em detoxificação celular.

Entre os contiguos com similaridade a genes do metabolismo basal, PSPB (metabolismo do oxigênio) teve a maior representação (18 ESTs), seguido do gene da carbonato desidratase (11 ESTs), um gene que codifica uma proteína associada a lipídeos (6 ESTs), cisteína sintase (3 ESTs), SPBC (3 ESTs), nitrofenilfosfatase (2 ESTs) e GIGANTEA (2 ESTs). O contiguo CGLMX11 teve a maior representação nessa biblioteca e mostrou similaridade a um gene com função desconhecida (55 ESTs) (Tabela 3).

Tabela 3. Genes identificados na biblioteca subtrativa da interação soja x *P. pachyrhizi* enriquecida para genes diferencialmente expressos aos 9 d.a.i.

Contíguo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
I. Resposta de defesa					
CGLMX131	NtPRp27 (<i>S. tuberosum</i>)	Proteína relacionada à patogênese em batata.	1E-34	AAO22065	2
CGLMX127	PR4 (<i>V. vinifera</i>)	Proteína relacionada à patogênese em uva	7,20E-76	CA934966	20
CGLMX130	R14 (<i>G. max</i>)	Gene de resistência em soja.	3,40E-62	TC228120	2
GLMX1H02	Thioredoxina peroxidase 1 (<i>S. lycopersicum</i>).	Proteína de regulação de H ₂ O ₂ na célula.	7,60E-109	TC225625	1
GLMX1E01	GbAF121356 Peroxiredoxina TPx2 (<i>A. thaliana</i>).	Atua como antioxidante e também regula o acúmulo de H ₂ O ₂ .	1,70E-37	TC222638	1
CGLMX140	Facilitador de difusão de cátions (<i>S. hamata</i>).	Defesa da célula através de destoxificação.	1,60E-61	TC224644	2
CGLMX121	CTV.15 (<i>P. trifoliata</i>)	Localizada em região genômica envolvida na resistência ao vírus da tristeza de citrus.	1,60E-8	BU761809	19
GLMX1B05	F12L6.9 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de resposta de resistência a doenças, membro de uma família de proteínas envolvidas em lignificação.	1,90E-18	TC216866	1
CGLMX132	Proteína rica em glicina (<i>A. thaliana</i>).	Componente celular da membrana, envolvida na deposição de calose em resposta a infecção por patógenos.	7,60E-25	TC230423	6

Continua...

Tabela 3. (Continuação)

Contíguo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
II. Resposta a estresse					
CGLMX106	Heme oxigenase 1 (<i>G. max</i>).	Resposta a estresses oxidativos.	2,90E-125	TC215659	26
CGLMX132	Proteína "Heat shock" (<i>G. max</i>).	Dobramento de proteínas induzidas por choque térmico.	2,40E-38	TC205309	3
CGLMX117	PSPB (<i>P. sativum</i>)	Proteína de cloroplasto envolvida no metabolismo do oxigênio em resposta a estresses.	1,10E-82	TC224543	18
CGLMX109	RD22 (<i>P. persica</i>)	Proteína de resposta a estresses hídricos e a patógenos.	1,20E-101	TC214141	7
GLMX12	SRC1 (<i>G. max</i>)	Resposta à desidratação.	6,80E-64	TC204489	12
III. Transcrição					
CGLMX119	BHLH fator de transcrição (<i>A. thaliana</i>).	Componente nuclear de regulação da transcrição em resposta a estresses hídricos	9,70E-68	TC226754	12
IV. Transdução de sinais					
CGLMX112	Calmodulina (<i>G. max</i>)	Proteína cinase envolvida em transdução de sinais.	2,90E-70	TC227523	12
CGLMX1F07	Adenilil ciclase (<i>D. discoideum</i>).	Proteína de membrana envolvida em sinalização.	0,00019	BG839047	2

Continua...

Tabela 3. (Continuação)

Contíguo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
IV. Transdução de sinais (Cont.)					
GLMX1E02	Fosfoglicerato quinase citosólica (<i>P. sativum</i>).	Enzima glicolítica de localização nuclear e que pode estar envolvida em processos celulares, possui um sinal de localização nuclear.	1,00E-29	TC204838	1
V. Transporte					
GLMX1F07	Transportador ABC (<i>Nostoc</i> sp.).	Mecanismos de defesa da célula através de detoxificação.	1,10E-61	NP_490401	1
CGLMX110	Alantoina permease (<i>P. vulgaris</i>).	Proteína envolvida em transporte de nitrogênio.	3,70E-54	TC214643	2
CGLMX401	Proteína hipotética Ta0149 (<i>Thermoplasma acidophilum</i>).	Proteína de membrana envolvida em transporte de pequenas moléculas e íons entre células.	6,30E-84	TC214624	17
CGLMX105	Proteína hipotética F11F8_10 (<i>A. thaliana</i>).	Envolvida na eliminação de substâncias tóxicas pela célula.	3,20E-69	TC220146	14
VI. Parede celular					
CGLMX118	Katanina (<i>Gossypium hirsutum</i>).	Biossíntese de parede celular.	4,10E-65	TC211260	6

Continua...

Tabela 3. (Continuação)

Contígulo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
VII. Metabolismo					
CGLMX123	RAD23 (<i>A. thaliana</i>)	Proteína de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos.	2,30E-131	TC226876	3
GLMX14A09	Cisteína sintase (<i>G. max</i>)	Biossíntese de aminoácido cisteína.	1,00E-58	TC226709	1
CGLMX103	Nitrofenilfosfatase (<i>A. thaliana</i>).	Metabolismo e transporte de carboidratos.	4,00E-43	BAA98057	2
GLMX1A01	HyuC-like protein (<i>A. thaliana</i>).	Atividade hidrolase, atua em ligações carbono-hidrogênios.	6,60E-41	TC226254	1
GLMX15H07	PRF 1604369A.0 226743 1 60 – SSG185 (<i>Volvox carteri</i>).	Glicoproteína de superfície sulfatada envolvida na divisão celular.	2,60E-48	TC224128	1
GLMX15F02	SPBC1711.12 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>).	Componente nuclear que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas (proteólise).	3,50E-38	TC203516	1
CGLMX120	RH3.3 (<i>O. sativa</i>)	Histona, proteína envolvida na montagem do nucleossomo.	4,60E-136	TC214463	18
CGLMX130	GIGANTEA (<i>A. thaliana</i>)	Proteína envolvida no controle do florescimento em resposta a fotoperíodo.	1,10E-47	TC204603	2
CGLMX116	OSJNBa0084K20.14 (<i>O. sativa</i>).	Participa de processos metabólicos com atividade catalítica.	1,60E-117	TC204698	3

Continua...

Tabela 3. (Continuação)

Contíguo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
VII. Metabolismo (Cont.)					
CGLMX128	Carbonato desidratase (<i>A. thaliana</i>).	Catalisa a conversão de ácido carbônico (H ₂ CO ₃) em CO ₂ e H ₂ O.	5,10E-95	TC230084	11
CGLMX107	Proteína associada a lipídeos em cloroplastos (<i>N. tabacum</i>).	Proteína constitutiva com atividade estrutural.	1,90E-96	TC226123	6
GLMX13D11	cnd41-like (<i>A. thaliana</i>)	Ligação ao DNA nuclear, envolvida em proteólise.	1,10E-61	TC21539	1
VIII. Fotossíntese					
CGLMX115	Fotossistema I, subunidade II (<i>S. lycopersicum</i>).	Componente celular do cloroplasto, com atividade na fotossíntese.	1,60E-44	TC20409	3
CGLMX114	ISPH (<i>N. tabacum</i>)	Proteína envolvida na síntese de clorofila.	9,60E-28	AY16888	7
CGLMX113	Fotossistema II, subunidade II (<i>Trifolium pratense</i>).	Componente de membrana, atua na fotossíntese.	1,90E-39	TC82763	2
GLMX14A08	Fosforibulocinase (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>).	Proteína envolvida em fotossíntese, catalisa reações do Ciclo de Calvin.	1,60E-118	TC22534	1

Continua...

Tabela 3. (Continuação)

Contígulo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
IX. Função desconhecida					
GLMX136	Gm_ck15879 (<i>G. max</i>); EST de uma biblioteca de soja que contem genes induzidos por ácido salicílico.	Desconhecida	2,30E-110	CD39580	1
CGLMX11	Proteína desconhecida (<i>G. max</i>).	Desconhecida	3,20E-135	CO98336	55
GLMX121	T2K10.10 (<i>A. thaliana</i>)	Desconhecida	1,50E-54	TC230819	1
CGLMX110	AT4g01320/F2N1_21 (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	2,00E-88	TC204879	7
GLMX13G06	AT5g47860/MCA23_20 (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	2,10E-49	BE330030	1
GLMX15B08	At5g52960 (<i>A. thaliana</i>)	Desconhecida	5,70E-44	TC218824	1
	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	3,80E-90	TC207727	1
CGLMX124	Proteína desconhecida (<i>O. sativa</i>).	Desconhecida	1,60E-51	TC21922	4
CGLMX108	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	1,10E-176	TC20475	3

Continua...

Tabela 3. (Final)

Contíguo/ Clone	Possível Proteína	Descrição	Valor e	Acesso	Nº ESTs
IX. Função desconhecida (Cont.)					
CGLMX104	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	6,40E-23	TC21812	2
CGLMX134	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	6,50E-89	BF42610	2
CGLMX135	Proteína desconhecida (<i>A. thaliana</i>).	Desconhecida	7,00E-124	TC21771	29

3.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

Dos seis genes avaliados como controle endógeno (Tabela 1), o de melhor desempenho foi o da α -tubulina, com boa eficiência de amplificação ($E = 99\%$) e menor alteração no nível de expressão nos diferentes tratamentos e tempos, sendo portanto utilizado como controle endógeno na análise da expressão dos genes selecionados.

A partir dos resultados das bibliotecas subtrativas foram selecionados 29 genes alvo para a confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Esta seleção teve como base a similaridade com genes envolvidos em resposta de defesa em outros patossistemas, a similaridade com genes de função ainda não determinada e representatividade nas bibliotecas. Além destes, foram incluídos nesta análise os genes chalcone sintase (X53958.1), quitinase I (AF202731), β -1,3 endoglucanase (M37753), peroxidase (AF007211), fenilalanina-amônia-liase (X52953), PR1 (AF136636) e metaloproteinase (AY057902) que estão envolvidos na resposta de soja a patógenos. (Akada et al., 1990; Gijzen et al., 2001; Takeuchi et al., 1990; Yi & Hwang, 1998; Frank & Vodkin, 1991; Kim et al., 2000; Liu et al., 2001).

Após a análise de amplificação específica, com base na curva de dissociação e análise do produto de PCR em gel de agarose 3,5%, foram selecionados 25 pares de oligonucleotídeos para o estudo da expressão gênica de 25 genes, sendo 21 correspondentes a genes presentes nas bibliotecas subtrativas e 4 genes incluídos na análise. Todos os oligonucleotídeos selecionados apresentaram eficiência de amplificação acima de 85%, com exceção dos correspondentes ao gene que codifica uma proteína facilitadora de difusão de cátions, que teve eficiência de 71%. Dentre os 25 genes analisados, 14 apresentaram expressão diferencial em resposta à inoculação com *P. pachyrhizi* e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão por RT-qPCR de 10 genes previamente identificados em duas bibliotecas de cDNA a *Phakopsora pachyrhizi* e mais 4 genes adicionais.

Contíguo/Clone	Genes	Acesso	Ident. na região de comparação	Oligonucleotídeos
CGLMX237	Catalase	TC22769	100%	PS11F: CCGATGGGTTGATGCTTTG PS11R: TCAGCCTGAGACCAGTATGATATCC
CGLMX109	RD22	TC214141	72,35%	PS15F: AGGTTGTGTCCACGGAAGTAGTG PS15R: CTCCCGGTGCTACGGTGTA
CGLMX106	Heme Oxigenase	TC215659	96.76%	PS23F: GATGATGACCTTCCACGATTGTT PS23R: CTTCCCGACTCCAAGTTCA
CGLMX105	Proteína hipotética F11F8_10	TC220146	62,96%	PS25F: TTCGTCATTGGCGGAAAATC PS25R: CGAATTTGCGGTTGAAGTTCTC
GLMX1E01	Peroxiredoxina	TC22638	99.38%	PS27F: CAGCACTGGAGATGGTGAAGTCACTC PS27R: TTGCTGGTGGGAAGACCTCAAG
CGLMX127	PR4	CA934966	77.95%	PS37F: GCCTCAGGGCCAACAATCT PS37R: TCCTGAGCGTTTGTCTAGTGTTT
CGLMX112	Calmodulina	TC227523	67,44%	PS38F: GGGTGAAGGGAGAAGAGGAAA PS38R: ACCCAAGTGATCCTATGATTTTTTAAG

Continua...

Tabela 4. (Final)

Contíguo/Clone	Genes	Acesso	Ident. na região de comparação	Oligonucleotídeos
CGLMX130	R14	TC228120	73,87%	PS42F: GCCTCAGGGCCAACAATCT PS42FR: TCCTGAGCGTTTGTCTAGTGTTT
GLMX1H02	Thioredoxina peroxidase	TC225625	79,63%	PS047: CAGCACTGGAGATGGTGAAGCTC PS047R: TTGCTGGTGGGAAGACCTCAAG
GLMX2E01	Chalcone isomerase	TC205536	100%	PS58F: CGCAGTTTGGCTTCTCGATT PS58R: GTTGATCCTTCTCATTCTCAGACTATAAT
-	Chalcone sintase	X53958.1		PS059F: CCGCGGCCCAACTGA PS59R: GCTGCACCATCTCCAACAA
-	Quitinase I	AF202731		PS60F: TTCTTGGCTCAAACCTTCTCATGAA PS60R: CCCACGCATATGGACCATCT
-	PR1 ácida	AF136636		PS64F: GCACTACACACAGGTCGTTTGG PS64R: CCTCCGTTATCACATGTCACTTTG
-	Metaloproteinase	AY057902		PS65F: TGGGCTCTTCCCAGTGAAA PS65R: TTGCCGCACTCTCCAAGTC

Entre os 14 genes com expressão diferencial (Figura 3), 10 (40% dos genes selecionados para a análise) são referentes a genes presentes na biblioteca subtrativa e 4 (16%) dos genes incluídos na análise. O gene PR1 foi induzido a 6 h.a.i, atingindo o máximo de expressão a 12 h.a.i., cerca de 450 vezes em relação ao controle não inoculado. O nível de expressão caiu às 36 h.a.i e voltou a subir nos tempos posteriores. O gene PR4, thioredoxina e R14 tiveram resposta semelhante com aumento no nível de indução com o avanço do tempo de colonização, apresentando picos de indução às 24 h.a.i e aos 8 d.a.i. Os genes quitinase I, calmodulina e proteína hipotética foram induzidos precocemente com um pico às 6 h.a.i, em seguida foi possível visualizar queda na expressão às 24 e 36 h.a.i e novo aumento na expressão no último tempo de coleta (8 d.a.i). Os genes da catalase e heme oxigenase tiveram o máximo de indução às 24 h.a.i e depois foi observada queda acentuada na expressão. Para os genes chalcone sintase e chalcone isomerase foi observado pico de expressão às 6 h.a.i e queda nos tempos posteriores. Para o gene que codifica uma peroxiredoxina, a indução foi máxima aos 8 d.a.i. O gene que codifica a metaloproteinase apresentou pico de expressão 6 h.a.i com queda nos tempos posteriores. O gene RD22 começou a ser induzido as 36 h.a.i atingindo nível de expressão de mais de 300 vezes aos 8 d.a.i. A expressão do gene F11F8_10 foi 2,5 vezes maior nas plantas inoculadas 12 h.a.i.

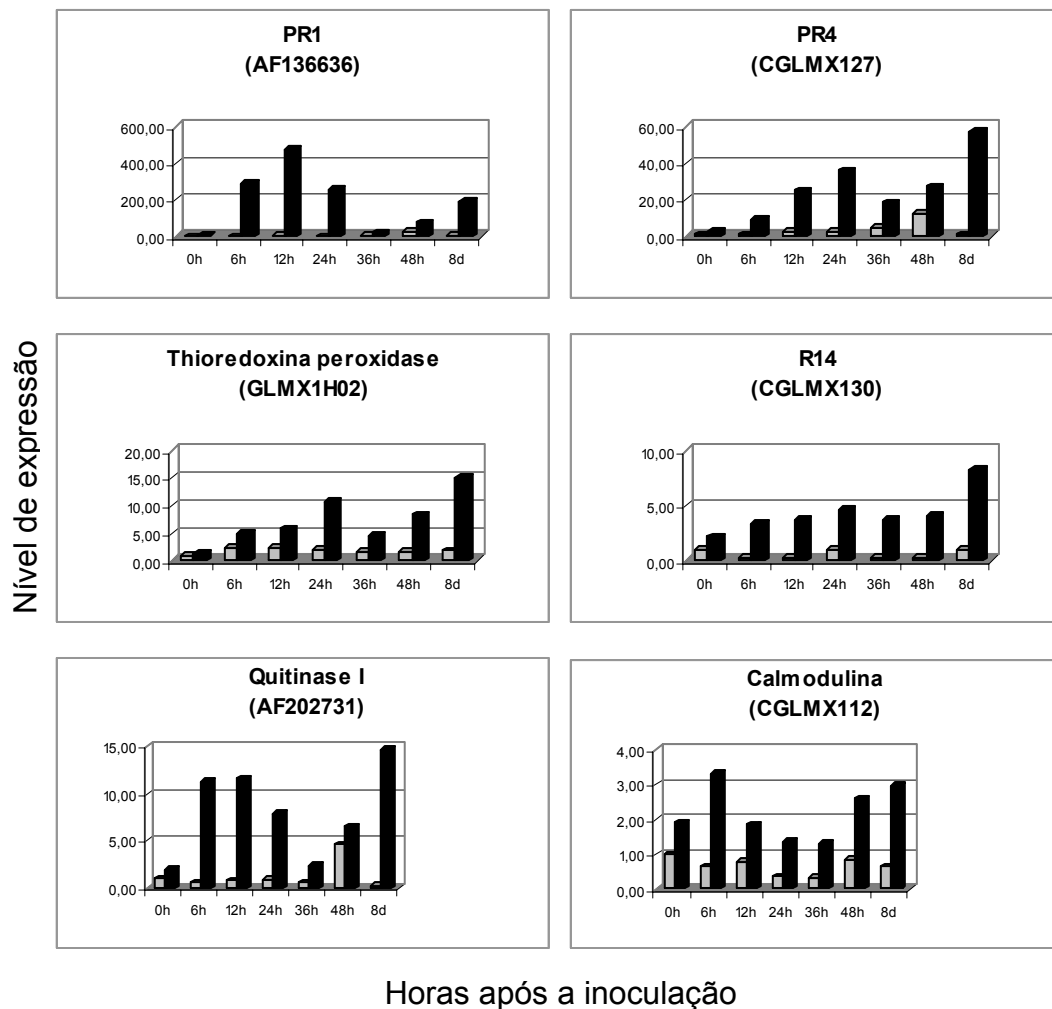
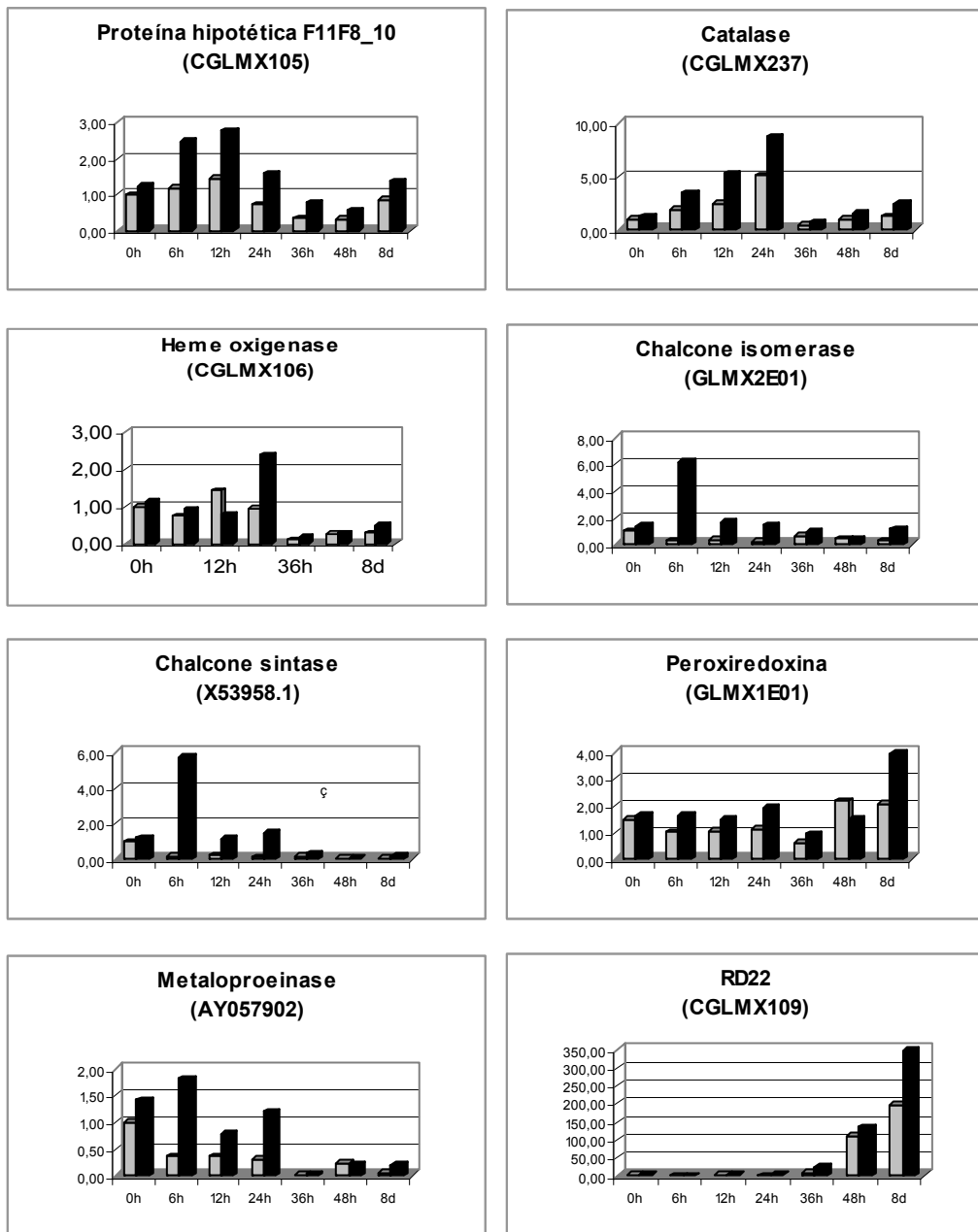


Figura 3. Análise da cinética de expressão de genes de soja em resposta à infecção pelo isolado monopustular PPUFV01 de *Phakopsora pachyrhizi*. O eixo x representa o tempo após a inoculação e o eixo y, o nível de expressão correspondente ao aumento da expressão em relação ao calibrador amostra 0 hora no tratamento não inoculado, normalizado pelo controle endógeno α tubulina. ■ = inoculado; ▒ = controle.

Nível de expressão



Horas após a inoculação

Figura 3. continuação

4. DISCUSSÃO

Por meio da construção de bibliotecas subtrativas foi possível identificar genes diferencialmente expressos na cultivar suscetível UFVS 2002 em resposta à infecção por *P. pachyrhizi*. Foram construídas duas bibliotecas, uma enriquecida para genes diferencialmente expressos aos 2 d.a.i e outra, para genes diferencialmente expressos aos 9 d.a.i. Os tempos usados para a construção da biblioteca foram escolhidos com base no processo de infecção de *P. pachyrhizi* em soja, especificamente, durante os eventos iniciais da patogênese (com 2 d.a.i), período em que os haustórios estão sendo formados e, portanto, um momento de intensa comunicação molecular entre o patógeno e a planta. Por outro lado, aos nove dias após a inoculação há uma intensa colonização da célula vegetal pelo patógeno, aumentando a chance de identificar genes diferencialmente expressos na interação. Segundo Bonde et al. (1976) os uredósporos de *P. pachyrhizi* iniciam sua germinação cerca de 1 a 2 horas após a adesão na superfície foliar e na presença de água livre, de 2 a 5 h.a.i podem ser visualizados os apressórios, sendo que a penetração ocorre preferencialmente de forma direta através da epiderme foliar, após 7 a 12 horas. Aproximadamente 24 h.a.i é possível visualizar o crescimento de hifas no espaço intercelular e com 48 h os haustórios são formados. Segundo os autores, as urédias são formadas de 6 a 8 d.a.i com posterior rompimento da epiderme e liberação dos uredósporos, fechando assim o ciclo da doença.

A biblioteca construída aos 2 d.a.i não apresentou grande diversidade de genes. Entretanto, a análise de ESTs permitiu a identificação de genes expressos em processos iniciais de resposta de defesa como o gene da catalase, envolvido na transdução de sinais em resposta a estresses oxidativos. Observou-se também o gene chalcone isomerase e um gene que codifica proteína rica em glicina, envolvidos na síntese de fitoalexinas e componentes da parede celular, respectivamente.

A catalase degrada e impede o acúmulo de H₂O₂, que serve como um sinal para a produção e acúmulo das proteínas relacionadas à patogênese e das fitoalexinas. É interessante notar que o pico máximo de indução do gene da catalase (24 h), ocorreu após o pico máximo de indução de genes que codificam proteínas envolvidas em resposta de defesa, como PR-1 (12 h) e Quitinase I (12 h).

Outros genes que codificam enzimas envolvidas com estresse oxidativo, como Thioredoxina e a Hemeoxygenase apresentaram padrão de indução similar a catalase. Patógenos biotróficos, como as ferrugens, possuem sofisticado mecanismo de patogênese que minimiza os danos nos tecidos do hospedeiro. Estudos recentes sugerem que patógenos biotróficos secretam proteínas efetoras capazes de suprimir as respostas de defesa da planta (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003; Glazebrook, 2005, Spanu, 2006). Proteínas efetoras de *P. pachyrhizi* ainda não foram identificadas. Todavia, caso sejam, seria interessante verificar se alguma delas tem a função de suprimir a resposta oxidativa, via supressão da expressão dos genes identificados nesse trabalho. É interessante notar que Rouhier et al. (2004) trabalhando com o gene thioredoxina em plantas infectadas com *Melampsora larici-populina*, agente causal da ferrugem de *Populus tremula*, obtiveram resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho. Os autores observaram uma expressão diferenciada para esse gene ao longo do processo infectivo, onde a expressão foi maior às 24 h.a.i, tendo novamente aumentando 10 d.a.i na interação compatível.

A biblioteca contendo genes diferencialmente expressos aos 9 d.a.i apresentou maior diversidade de genes. Nessa biblioteca foram encontrados genes que codificam proteínas envolvidas em resposta de defesa, e também no controle do estresse oxidativo. Uma característica na sintomatologia da ferrugem da soja é o intenso amarelecimento e clorose que resultam em redução da fotossíntese e desfolha prematura da planta (Bromfield & Hartwig, 1980). Estão representados nessa biblioteca genes de resposta a estresse por desidratação e genes que codificam proteínas envolvidas no processo fotossintético. Foram ainda identificados genes de função desconhecida que podem estar relacionados a processos específicos na interação. A expressão diferencial de genes envolvidos no estresse oxidativo neste tempo pode refletir

uma resposta da planta à intensa colonização dos tecidos pelo fungo, ou uma consequência do processo acelerado de senescência dos tecidos.

O gene que codifica a proteína PR4 (quitinase), está representado nas bibliotecas 2 d.a.i e 9 d.a.i e teve um aumento gradativo no nível de expressão com o tempo de infecção, atingindo o pico de expressão no último tempo de análise. Quitinases são importantes na degradação da parede celular de fungos (Rushton & Somssich, 1998). Kirubakaran & Sakthivel (2006), clonaram e superexpressaram o gene da quitinase. Em fumo observaram resistência a *Botrytis cinerea* e em plantas de arroz foi observada resistência a *Bipolaris oryzae*, *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani*. Estes resultados demonstram o amplo espectro de atividade antifúngica desse gene em plantas. Nandakumar et al. (2007) transformaram 4 genótipos de arroz com um gene da quitinase. As cultivares apresentaram cerca de 33% de resistência superior a plantas controle em casa de vegetação, sendo observado um aumento de 3 a 4 vezes no nível de expressão do gene da quitinase nas plantas transgênicas.

Outro gene interessante identificado na biblioteca 9 d.a.i. é representado pelo contiguo CGLMX130 similar ao gene R14 identificado por Graham et al. (2002). Estes autores sequenciaram o BAC 91F11 derivado da cultivar Williams 82 e identificaram 16 genes R diferentes em soja nesse BAC (R1 a R16), inclusive duas potenciais novas classes de genes de resistência (domínios TIR/NBS fusionada a proteína de defesa NtPRp27 e domínio TIR fusionado ao domínio de ligação calmodulina). O gene R14 codifica uma proteína com os domínios TIR e NBS fusionados a uma proteína tipo NtPRp27 que é uma proteína putativa relacionada à defesa envolvida na sinalização *down-stream*. Curiosamente, na biblioteca 9 d.a.i também foram identificadas duas ESTs com similaridade a NtPRp27. Os autores afirmam que a expressão desse gene foi constitutiva, diferente dos resultados obtidos neste trabalho, onde o gene R14 demonstrou ser responsivo a infecção por *P. pachyrhizi*, com o pico de indução aos 8 dias após a inoculação com um aumento de 8 vezes em relação ao controle não inoculado.

Metaloproteinases representam importantes proteínas de defesa contra patógenos em mamíferos através da produção de compostos antimicrobianos (Liu et al., 2001). O gene GmMMP2 que codifica uma matrix metaloproteinase, foi induzido por volta de 4 h.a.i em soja em resposta a infecção por

Phytophthora sojae e *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* em interações compatíveis e incompatíveis. Estes resultados sugerem que esta proteína pode estar envolvida em uma nova resposta de defesa, uma vez que em soja sua expressão é independente de ácido salicílico e do ácido jasmônico. Sugere-se que sua ativação ocorra por uma outra via de sinalização na qual estes compostos não tenham importância como moléculas sinalizadoras (Liu et al., 2001). Assim, embora o nível de expressão do gene da metaloproteinase observado no presente trabalho ter sido baixo, é possível que este gene tenha algum papel na resposta à infecção por *P. pachyrhizi*.

O gene RD22 é responsivo a desidratação e em *Arabidopsis* sua expressão é mediada pelo ácido abscísico (ABA), que é produzido sob condições de déficit hídrico e importante no desenvolvimento de tolerância à seca. Abe et al. (1997) relataram que proteínas regulatórias induzidas por ABA estão envolvidas na ativação transcricional de RD22. Na análise de expressão, esse gene foi induzido pelo patógeno atingindo o pico de expressão aos 8 d.a.i, momento este que as folhas apresentavam os sinais e sintomas característicos da ferrugem, ou seja, grande número de urédias e intenso amarelecimento das folhas. É possível que o aumento da expressão desse gene neste momento reflita uma resposta da planta à perda de H₂O decorrente da ruptura da epiderme pelas urédias.

Recentemente, van de Mortel et al. (2007) relataram a análise da expressão gênica em plantas resistentes e suscetíveis de soja a *P. pachyrhizi* utilizando microarranjos. Os autores observaram um padrão de expressão gênica bimodal, similar ao padrão de expressão observado neste trabalho. A expressão gênica foi induzida às 6 e 12 h.a.i, tendo a expressão da maioria dos genes retornada a níveis do controle às 24 h.a.i e voltando a subir durante os últimos estágios do processo infectivo, tanto na interação compatível como na interação incompatível. Os autores sugerem que o fungo inibe as respostas do hospedeiro neste período a fim de que a interação seja estabelecida, uma vez que foi demonstrado que ferrugens são capazes de secretar proteínas que têm acesso ao citoplasma da célula vegetal (van de Mortel et al., 2007).

Em síntese, a técnica SSH foi eficiente para identificar genes diferencialmente expressos na interação soja UFVS 2002- *P. pachyrhizi*.

Todavia, Eestudos funcionais deverão ser efetuados para confirmar e quantificar o papel dos genes indentificados na interação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKADA, S.; KUNG, S. D.; DUBE, S. K. The nucleotide sequence of gene 3 of the soybean chalcone synthase multigene family. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.5899, 1990.

AYLIFFE, M. A.; ROBERTS, J. K.; MITCHELL, H. J.; ZHANG, R.; LAWRENCE, G. J.; ELLIS, J. G.; PRYOR, T. J. A plant gene up-regulated at rust infection sites. **Plant Physiology**, v.129, p.169-180, 2002.

BERNARDO, A.; BAI, G.; GUO, P.; XIAO, K.; GUENZI, A. C.; AYOUBI, P. *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. **Functional and Integrative Genomics**, v.7, p.69-77, 2007.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K.R. Histology of the susceptible-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v.66, p.1290-1294, 1976.

BROMFIELD, K. R. Differential reaction of some soybean accessions to *Phakopsora pachyrhizi*. **Soybean Rust Newsletter**, v.4, p.2, 1981. (Abstract)

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

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p.169–193, 2000.

CHEONG, Y. H.; CHANG, H. S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding,

pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.129, p.661-677, 2002

DESENDER, S.; ANDRIVON, D.; VAL, F. Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity?. **Cellular Microbiology**, v.9, n.1, p.21–30, 2007.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y-F. C.; CAMPBELL, A., P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; ANOV, K. L.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.93, p.6025-6030, 1996.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M-C.; PETITOT, A-S.; SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v.5, n.6, p.527-536, 2004.

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, v.16, p.449-455, 2000.

FORMENTO, A. N.; SOUZA, J.; VICENTIN, I. G.; Field survey of *Phakopsora pachyrhizi* on several hosts in Argentina.

FOSTER-HARTNETT, D.; DANESH, D.; PEÑUELA, S.; SHAROPOVA, N.; ENDRE, G.; VANDENBOSCH, K. A.; YOUNG, N. D.; SAMAC, D. A.. Molecular and cytological responses of *Medicago truncatula* to *Erysiphe pisi*. **Molecular Plant Pathology**, v.8, n. 3, p.307–319, 2007.

FRANK, R. L.; VODKIN, L. O.; Sequence and structure of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Glycine max*. **DNA Sequence**, v.1, n.5, p.335-346, 1991.

FREDERICK, R. D., SYNDER, C. L., PETERSON, G. L., BONDE, R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the

soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi* and *Phakopsora meibomiaae*. **Phytopathology**, v. 92, n. 2, p. 217-227, 2002.

GIJZEN, M.; KUFLU, K.; QUTOB, D.; CHERNYS, J. T. A class I chitinase from soybean seed coat. **Jouranl of Experimental Botany**, v.52, n.365, p.2283-2289, 2001.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.9.1-9.23, 2005.

GRAHAM, M. A.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Organization, expression and evolution of a disease desistance gene cluster in soybean. **Genetics**, v.162, p.1961–1977, 2002.

GRAHAM, M. Y.; WEIDNER, J.; WHEELER, K.; PELOW, M. J.; GRAHAM, T. L. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.63, p.141–149, 2003.

GUIRRA, F. Combate ao fungo, safra junho/2007. Documento 150_Publicação online: http://www.agrodefesa.gov.br/sanidadevegetal/Rep_Safra.pdf

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annual Review Plant Physiology**, v.48, p.575–607, 1997.

HARTMAN, G. L., MILES, M. R., & FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. **Plant Disease**, v. 89, p.664-666, 2005.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; AND HYMOWITZ, T. Sources of resistance to soybean rust in perennial *Glycine* species. **Plant Disease**, v.76, p.396-399, 1992.

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

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major genes conferring to rust in soybeans. **Crop Science**, v.26, p.1135-1136, 1986.

HEATH, M. C. Cellular interactions between biotrophic fungal pathogens and host or nonhost plants. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.24, p.259–264, 2002.

http://www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/soja/roya/articulos/20419_051130_trab_4.pdf

KIM, C. S.; YI, S. Y.; LEE, Y. K.; HWANG, B. K. Isolation and differential expression of an acidic PR-1 cDNA gene from soybean hypocotyls infected with *Phytophthora sojae* f.sp. *glycines*. **The Plant Pathology Journal**, v.16, n.1, p.9-18, 2000.

KIRUBAKARAN, S. I.; SAKTHIVEL, N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.52, p.159-166, 2007.

KOLOMIETS, M. V.; CHEN, H.; GLADON, R. J.; BRAUN, E. J.; HANNAPEL, D. J. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. **Plant Physiology**, v.124, p.1121–1130, 2000.

KONG, L.; ANDERSON, J. M.; OHM, H. W. Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. **Genome**, v.48, p.29-40, 2005.

LEAL JR, G., A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Plant Pathology**, v.8, n.3, p.279–292, 2007.

LIU, Y.; DAMMANN C.; BHATTACHARYYA, M. K. A Matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. **Plant Physiology**, v.127, p.1788-1797, 2001.

MACKINTOSH, C., A.; LEWIS, J.; RADMER, L. E.; SHIN, S.; HEINEN, S. J.; SMITH, L. A.; WYCKOFF, M. N.; DILL-MACKY, R.; EVANS, C. K.; KRAVCHENKO, S.; BALDRIDGE, G. D.; ZEYEN, R. J.; MUEHLBAUER, G. J. Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. **Plant Cell Reporter**, v.26, p.479–488, 2007.

MAKANDAR, R., ESSIG, J. S.; SCHAPAUGH, M. A.; TRICK, H. N.; SHAH, J. Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.19, p.123–129, 2006.

MATTHIAS, H.; MENDGEN, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. **Current Opinion in Plant Biology**, n.4, p.322-327, 2001.

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

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

MOY, P.; QUTOB, D.; CHAPMAN, B. P.; ATKINSON, I.; GIJZEN, M. Patterns of gene Expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 17, p.1051-1062, 2004.

MUR, L.A.J., KENTON, P., AND DRAPER, J. In planta measurements of oxidative bursts elicited by avirulent bacterial pathogens suggest that H₂O₂ is insufficient to elicit cell death in tobacco. **Plant Cell Environment**, v. 28, p.548–561, 2005.

Nandakumar, R.; Babu, S.; Kalpana, K.; Raguchander, T.; Balasubramanian, P.; Samiyappan, R. *Agrobacterium* -mediated transformation of indica rice with chitinase gene for enhanced sheath blight resistance. **Biologia Plantarum**, v.51, p.142-148, 2007.

OLDACH K. H.; BECKER D.; LÖRZ, H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.14, p.832–838, 2001

OUCHI, S. A Retrospective of an unconventionally trained plant pathologist: Plant diseases to molecular plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.1-17, 2006.

PESSOA, A. Forecast: Cenários para oferta e demanda de soja e milho. **Agroconsult**. 2007.

POSADA-BUITRAGO, M. L.; BOORE, J. F.; FREDERICK, R. D. **Soybean Rust Genome Project**. In: First Annual DOE Joint Genome Institute User Meeting. U.S. Department of Energy Office of Science, 2006. (Publicação online) <http://www.jgi.doe.gov/meetings/usermtg06/AbstractBookFINAL-MAY2006.pdf>

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

PRECCOTT, A.; MARTIN C. Rapid method for quantitative assessment of levels of specific mRNAs. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.4, p. 219, 1987.

RINALDI, C.; KOHLER, A.; FREY, P.; DUCHAUSSOY, F.; NINGRE, N.; COULOUX, A.; WINCKER, P.; LE THIEC, D.; FLUCH, S.; MARTIN, F.; DUPLESSIS, S. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. **Plant Physiology**, v.144, p.347-366, 2007.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; GUALBERTO, J. M.; JORDY, M. N.; FAY, E.; HIRASAWA, M.; DUPLESSIS, S.; LEMAIRE, S. D.; FREY, P.; MARTIN, F.; MANIERI, W.; KNAFF, D. B.; JACQUOT, J. P. Poplar Peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked cChloroplast antioxidant functional in pathogen defense. **Plant Physiology**, v. 134, p.1027–1038, 2004.

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.311–315, 1998.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **Journal of Phytopathology**, v.132, p.339–342, 1991.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J. P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S. C.; MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.97, n.21, p.11655-11660, 2000.

SCHEUERMANN, K. K. Identificação de genes diferencialmente expressos na interação tomateiro – *Alternaria solani*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Viçosa, 2006. 99p.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming the host cells for disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.41, p.641-667, 2003.

SPANU, P. D. Why do some fungi give up their freedom and become obligate dependants on their host? **New Phytologist**, v.171, p.447-450, 2006.

TIAN, Z. D.; LIU, J.; XIE, C. H. Isolation of resistance related-genes to *Phytophthora infestans* with suppression subtractive hybridization in the R-gene free potato. **Acta Genetica Sinica**, v.30, p.597-605, 2003.

TORREGROSA, C.; CLUZET, S.; FOURNIER, J.; HUGUET, T.; GAMAS, P.; PROSPÉRI, J-M.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M-T.; DUMAS, B.; JACQUET, C. Cytological, genetic, and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.17, p.909–920, 2004.

VAN MORTEL, M.; RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D.; DITTAN, J.; NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Distinct biphasic mRNA changes in

response to asian soybean rust infection. **Molecular Plant Microbe interactions**, v.20, p.887-899, 2007.

XIONG, L.; LEE, M-W.; QI, M.; YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.685-692, 2001.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul. Embrapa Soja. **Documentos**, 236. 2004. 30p. <http://www.cnpso.embrapa.br/download/alerta/documentos236.pdf>

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

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

6. ANEXOS

Tabela 1. Análise de variância para a variável lesões/cm² em feijão-caupi.

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	55	17991,63	327,12	0
Genótipos	54	17666,30	18,69	18,69*
G vs Test	1	325,33	325,33	18,58*
RESÍDUO	168	2940,5	17,50	
TOTAL	223	20932,13		

Tabela 2. Análise de variância para a variável lesões/cm² em guandu.

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	65	20839,10	320,60	24,10
Genótipos	64	20083,85	313,81	23,59
G vs Test	1	755,24	755,24	56,77
RESÍDUO	198	2634,0	13,30	
TOTAL	263	23473,10		

Tabela 3. Análise de variância para a variável lesões/cm² em feijão-comun.

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	13	2285,30	175,79	22,49
Genótipos	12	1547,27	128,94	16,50
G vs Test	1	738,03	738,03	
RESÍDUO	42	328,25	7,82	
TOTAL	55	2613,55		

Tabela 4. Teste de média Dunett para variável lesões/cm² nos genótipos de *V. unguiculata* L., *C.cajan* e *P. vulgaris* L.

Feijão-caupi			Guandu			Feijão-comun		
Tratamento	Média	Grupo	Tratamento	Média	Grupo	Tratamento	Média	Grupo
Vu 45	33,5	a	Cc 6	36,75	a	Soja	24,5	A
Vu 32	33,25	a	Cc 33	27	b	6	20,	B
Vu 53	31,75	a	Soja	22,5	b	11	19,75	B
Vu 49	31,5	a	Cc 1	22	b	2	17,	B
Vu 50	26,75	b	Cc 47	21,5	b	8	12,75	C
Vu 48	25,5	b	Cc 18	20	b	7	11,	C
Vu 39	25,5	b	Cc 17	20,b		13	10,	C
Vu 56	25,25	b	Cc 8	19,	c	5	9,75	C
Vu 60	25,5	b	Cc 12	18,5	c	1	8,75	C
Vu 58	25,5	b	Cc 20	18,25	c	3	8,	C
Vu 54	23,5	b	Cc 9	18,	c	12	7,25	C
Soja	22,75	b	Cc 49	17,75	c	4	5,	D
Vu 2	22,	c	Cc 27	17,25	c	9	3,25	D
Vu 38	20,75	c	Cc 7	17,25	c	10	2,75	D
Vu 51	20,25	c	Cc 46	17,	c			
Vu 25	18,75	c	Cc 4	16,25	c			
Vu 29	17,75	c	Cc 26	16,	c			
	Vu 30		16,75	d	Cc 3	15,25	c	
Vu 41	16,25	d	Cc 2	15,25	c			
Vu 37	15,5	d	Cc 14	14,75	c			
Vu 59	15,25	d	Cc 19	14,5	c			
Vu 26	14,25	d	Cc 24	14,25	c			
Vu 16	14,25	d	Cc 15	14,25	c			
Vu 36	13,75	d	Cc 3	15,25	c			
Vu 33	13,75	d	Cc 39	12,5	d			
Vu 1	13,75	d	Cc 65	11,25	d			
Vu 44	12,5	d	Cc 10	11,25	d			
Vu 9	12,25	d	Cc 21	11,	d			
Vu 35	12,	d	Cc 16	10,25	d			
Vu 17	12,	d	Cc 11	10,25	d			
Vu 52	11,75	d	Cc 22	10,	d			
Vu 27	11,75	d	Cc 64	9,25	d			
Vu 24	11,75	d	Cc 25	9,25	d			
Vu 23	10,25	d	Cc 23	7,75	e			
Vu 19	10,25	d	Cc 34	4,75	e			
Vu 55	10,	d	Cc 42	2,5	e			
Vu 34	9,75	d	Cc 39	12,5	d			
Vu 12	9,75	d	Cc 65	11,25	d			
Vu 10	9,5	d	Cc 10	11,25	d			
Vu 18	7,75	e	Cc 5	13,5	d			
Vu 20	7,5	e	Cc 55	0	e			
Vu 13	7,25	e	Cc 53	0	e			
Vu 47	7,	e	Cc 52	0	e			

Continua...

Tabela 4. (Final)

Feijão-caupi			Guandu			Feijão-comun		
Tratamento	Média	Grupo	Tratamento	Média	Grupo	Tratamento	Média	Grupo
Vu 28	5,75	e	Cc 51	0	e			
Vu 4	5,75	e	Cc 50	0	e			
Vu 31	5,	e	Cc 48	0	e			
Vu 15	4,25	e	Cc 45	0	e			
Vu 14	3,	f	Cc 44	0	e			
Vu 40	0	f	Cc 43	0	e			
Vu 22	0	f	Cc 41	0	e			
Vu 21	0	f	Cc 40	0	e			
Vu 7	0	f	Cc 38	0	e			
Vu 6	0	f	Cc 37	0	e			
Vu 5	0	f	Cc 36	0	e			
Vu 3	0	f	Cc 35	0	e			
			Cc 32	0	e			
			Cc 31	0	e			
			Cc 30	0	e			
			Cc 29	0	e			
			Cc 28	0	e			
			Cc 13	0	e			