

**VALERIA YUKARI ABE**

**EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES DE *Phakopsora pachyrhizi* EM  
GENÓTIPOS RESISTENTES DE SOJA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO  
DE GENES DE AVIRULÊNCIA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012

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

T

A138e  
2012

Abe, Valeria Yukari, 1985-

Expressão transiente de genes *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos resistentes de soja visando a identificação de genes de avirulência / Valeria Yukari Abe. – Viçosa, MG, 2012. viii, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 45-53.

1. Ferrugem-da-soja. 2. Soja - Resistência a doenças e pragas. 3. *Phakopsora pachyrhizi*. 4. Genes. 5. *Glycine max*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.49

**VALERIA YUKARI ABE**

**EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES DE *Phakopsora pachyrhizi* EM  
GENÓTIPOS RESISTENTES DE SOJA VISANDO A IDENTIFICAÇÃO  
DE GENES DE AVIRULÊNCIA**

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2012.

---

Marisa Vieira de Queiroz

---

Gleiber Quintão Furtado

---

Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Masayuki e Lúcia pelo exemplo de vida, sempre muito dedicados, batalhadores, permitindo-me alcançar este sonho.

Aos meus irmãos Massaru, Sayuri e Masami, que mesmo à distância me ensinam e me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu namorado Bruno, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional a todas as minhas decisões.

Aos meus amigos do Laboratório de Genômica: Livia, Poli, Nat, Daniel, Gabi, Gus, Josney, Rafinha, Jamile, Tadeu, Gilson, Thiago, Tácio, Marcos, Éder, Luís, Ricardo, Michelle, Sandra, Elias e Dani. Vocês foram a minha segunda família no decorrer do mestrado, sou muito grata pelos churrascos, bolos de aniversário, aquela “mãozinha” nos momentos mais difíceis, largos sorrisos de encorajamento e acima de tudo, a amizade.

Às amigas da fitopatologia, Meiriele e Paula, que transformaram esta etapa da vida mais rica e prazerosa.

Aos meus amigos remanescentes e os que visitam ocasionalmente Viçosa, galera da Agronomia, muitas boas lembranças, momentos de alegria e palavras de conforto.

Ao meu orientador, Professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela orientação.

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

À Capes pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1- Introdução .....	1
2- Revisão de Literatura .....	4
2.1- A cultura da soja .....	4
2.2- A Ferrugem Asiática da Soja .....	4
2.2.1- Ciclo de vida de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	6
2.2.2- Métodos de controle da ferrugem asiática da soja .....	8
2.3- O sistema imune vegetal .....	10
2.3.1- Proteínas efetoras de fitopatógenos .....	12
2.4- Métodos de análise funcional de proteínas efetoras .....	16
3- Objetivos .....	20
3.1- Objetivo geral .....	20
3.2- Objetivos específicos .....	20
4- Material e Métodos .....	21
4.1- Análise da expressão transiente do gene repórter <i>GUSPlus</i> em soja e em tabaco mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	21
4.1.1- Preparo das plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> e de soja .....	21
4.1.2- Estirpe de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contendo o vetor com o gene <i>GUSPlus</i> .....	21
4.1.3- Agroinfiltração .....	22
4.1.4- Avaliação da expressão do gene repórter <i>GUSPlus</i> .....	24
4.2- Estabelecimento de um protocolo de análise funcional de proteínas secretadas pelo isolado PPUFV02 em soja, baseado no SST3 de Psg4 .....	24
4.2.1- Material vegetal .....	24
4.2.2- Preparo da suspensão bacteriana de Psg4 e inoculação por infiltração a vácuo para a avaliação da suscetibilidade dos genótipos de soja .....	25
4.2.3- Preparo de células eletrocompetentes, transformação de Psg4 com o vetor pVSP61 e posterior inoculação de plantas de soja .....	25

4.3- Avaliação da atividade efetora de proteínas candidatas de <i>P. pachyrhizi</i> que codificam proteínas secretadas.....	26
4.3.1- Clonagem e transformação de Psg4 com o vetor pEDV6 contendo os genes que codificam para proteínas secretadas na interação soja - <i>P. pachyrhizi</i> .....	26
4.3.2- Avaliação da indução da reação de hipersensibilidade por Psg4 transformada com os genes candidatos clonados no vetor pEDV6 .....	28
4.3.3- Análise funcional dos genes candidatos a efetores em genótipos de soja resistentes ao isolado PPUFV02, baseada no SST3 de Psg4 .....	29
5- Resultados.....	30
5.1- Análise da expressão transiente do gene repórter <i>GUSPlus</i> em soja e em tabaco mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
5.2- Estabelecimento de um protocolo para a análise funcional de proteínas secretadas em soja, utilizando a traslocação mediada pelo SST3 de Psg4 .....	31
5.3- Clonagem dos genes candidatos a efetores de <i>P. pachyrhizi</i> no vetor pEDV6 e análise de expressão transiente mediado pelo SST3 de Psg4.....	34
6- Discussão .....	40
7- Conclusões .....	44
8- Referências bibliográficas.....	45

## RESUMO

ABE, Valeria Yukari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Expressão transiente de genes de *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos resistentes de soja visando a identificação de genes de avirulência.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Atualmente, o principal fator limitante na produção desta cultura é a ferrugem asiática da soja (FAS), cujo agente etiológico é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Os fungos causadores das ferrugens são parasitas obrigatórios que durante sua interação com a planta secretam proteínas efetoras que manipulam o metabolismo do hospedeiro e interferem com suas respostas de defesa. Algumas dessas proteínas efetoras, denominadas proteínas Avr, são reconhecidas pelas proteínas codificadas por genes de resistência *R*, o que desencadeia a resposta de hipersensibilidade (HR) e fenótipo de resistência. Já foram descritos pelo menos cinco genes *R* (*Rpp1* a *Rpp5*) que conferem resistência a FAS e vários genes que codificam proteínas secretadas por esse fungo foram recentemente identificados. Todavia, ainda não foram identificadas as proteínas efetoras (Avr) reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes *Rpp*. Como não existe ainda um sistema de transformação para *P. pachyrhizi*, uma estratégia para identificar as proteínas Avr desse fungo é a expressão transiente das proteínas efetoras candidatas no citoplasma de variedades resistentes e a observação do possível desencadeamento de resposta de HR. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram tentar estabelecer uma metodologia de expressão transiente em soja via agroinfiltração utilizando como gene repórter o gene *GUSPlus*; estabelecer um protocolo de translocação de proteínas efetoras via sistema de secreção tipo III (SST3) de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* raça 4 (Psg4), e também avaliar a atividade efetora de genes candidatos em genótipos de soja resistentes ao isolado monopustular PPUFV02 de *P. pachyrhizi*. Não se observou a expressão do gene *GUSPlus* em folhas de soja agroinfiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA105, enquanto que utilizando do mesmo preparo de inóculo e concentração de células bacterianas, observou-se a expressão consistente do gene *GUSPlus* em tabaco. Este resultado inviabilizou o uso de agroinfiltração no estudo funcional de genes efetores

candidatos na soja. Todos os genótipos de soja avaliados foram suscetíveis a Psg4, demonstrando a viabilidade do uso desta bactéria na análise funcional de proteínas candidatas a efetores mediada por SST3. Melhor reprodutibilidade de sintomas foi observada com a inoculação por infiltração a vácuo de Psg4 numa concentração bacteriana de OD600=0,01, por permitir uma análise dos sintomas de forma gradual. O produto do gene *avrB* é reconhecido pelo produto do gene *RPG1*, presente em alguns genótipos de soja. A construção pVSP61-*avrB*, foi capaz de induzir HR no genótipo Williams 82, que contém o gene *RPG1* correspondente, e nos genótipos Conquista e PI 459025. Este resultado permitiu o uso desta construção como controle positivo para a análise funcional de proteínas efetoras putativas de *P. pachyrhizi*. Assim, 12 sequências foram clonadas no vetor pEDV6. Este vetor permite a expressão de proteínas de interesse fusionadas a sequências-sinais de secreção via SST3, visando a sua posterior translocação para o citosol. Nove das construções com pEDV6-PHPA\_RSP transformadas em Psg4 foram submetidas à análise funcional. As plantas inoculadas variaram quanto à severidade dos sintomas observados e não foi constatado fenótipo de HR. Ao invés disso, nos tratamentos foi observado redução, aumento ou ausência de alteração significativa na evolução dos sintomas, de maneira genótipo-dependente. Esses estudos permitiram uma primeira triagem de candidatos a efetores de *P. pachyrhizi*, selecionando os candidatos PHPA\_RSP\_71 e PHPA\_RSP\_78 como os mais promissores para estudos futuros mais detalhados.

## ABSTRACT

ABE, Valeria Yukari, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Transient expression of genes of *Phakopsora pachyrhizi* in resistant soybean genotypes aiming the identification of avirulence genes.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Brazil is the second world soybean producer. Currently, the main limiting factor in this crop production is the Asian soybean rust (ASR) whose etiologic agent is the fungus *Phakopsora pachyrhizi*. The rust fungi are obligate parasites that during their interaction with the plant, they secrete effector proteins that manipulate host metabolism and interfere with their defense responses. Some of these effector proteins, called Avr proteins, are recognized by encoded proteins by resistant *R* genes, which usually trigger a hypersensitivity response (HR) and resistance phenotype. At least, there are five described *R* genes (*Rpp1* to *Rpp5*) that confer resistance to ASR and several genes that encode secreted proteins by this fungus were recently identified. However, the effector proteins (Avr) recognized by encoded proteins by *Rpp* genes were not identified yet. Since there is not a transformation assay protocol for *P. pachyrhizi*, a strategy to identify this fungus Avr proteins is the transient expression of R proteins in resistant varieties cytoplasm and the observation of a possible HR response. Thus, the specific objectives of this work were: to try to establish a methodology for transient expression in soybean by agroinfiltration using the gene *GUSPlus* as reporter gene; to establish a protocol for translocation of effector proteins by the type III secretion system (SST3) of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* race 4 (Psg4), and also to evaluate the effector activity of candidate genes in soybean resistant genotypes to the isolate PPUFV02 of *P. pachyrhizi*. There was no expression of the gene *GUSPlus* in *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 infiltrated soybean leaves, while using the same inoculum preparation and concentration of bacterial cells, there was a consistent expression of the gene *GUSPlus* in tobacco. This result derailed the use of agroinfiltration in the functional study of candidate genes in soybean effectors. All soybean genotypes evaluated were susceptible to Psg4, demonstrating that the viability to use this bacterial on functional analysis of candidate effector proteins mediated by SST3. Better symptoms reproducibility

was observed with inoculation by vacuum infiltration of Psg4 in a bacterial concentration of  $OD_{600} = 0,01$ , for allowing a gradually symptoms analysis. The encoded protein by *avrB* gene is recognized by the *RPG1* gene product, which is present in some genotypes of soybean. The construction pVSP61-*avrB* was able to induce HR in the genotype Williams 82, that contains the corresponding gene *RPG1* and to induce it in the genotypes Conquista and PI 459025. This result allowed the use of this construction as a positive control for functional analysis of *P. pachyrhizi* putative effector proteins. Because of this, 12 sequences were cloned into vector pEDV6. This vector allows the expression of proteins of interest fused to secretion signal sequences by SST3, aiming its subsequent translocation into the cytosol. Nine from the constructions with pEDV6-PHPA\_RSP transformed into Psg4 were submitted to functional analysis. The inoculated plants varied in severity of observed symptoms and no HR phenotype was observed. Instead, it was observed reduction, increase or absence of a significant change in the symptoms evolution of genotype-dependent manner in treated plants. These studies allowed a first screening of *P. pachyrhizi* effector candidates, selecting the candidates PHPA\_RSP\_71 and PHPA\_RSP\_78 as the most promising candidates for further detailed analysis.

## 1- Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta da família Fabaceae, originária da Ásia Oriental, onde é cultivada há centenas de anos. Atualmente, esta espécie é cultivada em todo o mundo, possuindo inúmeras finalidades, não só como alimentação humana e animal, mas também na produção de biocombustíveis, lubrificantes, sabões, etc (Sediyama *et al.*, 2009).

Hoje o Brasil se destaca como o segundo maior produtor de soja do mundo (Conab, 2012). No entanto, sua produção é limitada por diversos problemas fitossanitários, dos quais se destaca a ferrugem asiática da soja (FAS), cujo agente etiológico é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow). A FAS encontra-se disseminada em quase todas as regiões produtoras de soja, o que acarreta um aumento dos custos de produção devido à necessidade do seu controle com o uso de fungicidas, principal método hoje adotado (Consórcio Antiferrugem, 2011).

Os fungos causadores de ferrugens são parasitas obrigatórios, sendo dependentes do seu hospedeiro para o seu crescimento e absorção de nutrientes. Durante sua interação com a planta hospedeira, estes fungos formam uma estrutura especializada denominada haustório que possui um papel essencial na aquisição dos nutrientes. Existem fortes evidências de que o haustório também esteja envolvido no redirecionamento de proteínas efetoras do fungo para o apoplasto da célula vegetal de plantas hospedeiras (Catanzariti *et al.*, 2007; Dodds *et al.*, 2009).

As proteínas efetoras de fitopatógenos são moléculas que aumentam o potencial de infecção e colonização do hospedeiro, estando envolvidos na supressão das respostas de defesa ou alteração do metabolismo da planta hospedeira (Kamoun, 2009). Muitas dessas proteínas efetoras, denominadas proteínas Avr, são reconhecidas pelas proteínas codificadas por genes de resistência (*R*). Esta é a base da teoria gene a gene proposta por Flor (1942), que demonstrou com base em estudos genéticos do patossistema linho-*Melampsora lini* que, para cada gene dominante de avirulência no patógeno, há um gene correspondente de resistência no hospedeiro, de forma que a interação direta ou

indireta entre os produtos desses dois genes leva à ativação de respostas de defesa do hospedeiro, dentre elas a resposta de hipersensibilidade (HR), que limita o crescimento de fungos biotróficos (Stergiopoulos & De Wit, 2009; De Wit *et al.*, 2009).

Já foram descritos sete genes *Rpp* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*) em cinco locos (*Rpp1* a *Rpp5*) em soja, que conferem resistência à FAS (Hidayat & Somaatmadja, 1977; McLean & Byth, 1980; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia *et al.*, 2008; Chakraborty *et al.*, 2009), e vários genes de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas foram identificados por Zaramela (2011). Todavia ainda não se efetuou a análise funcional desses genes, visando identificar genes que codificam proteínas Avr.

Como ainda não existe um sistema de transformação para *P. pachyrhizi*, uma estratégia para identificar as proteínas efetoras desse fungo é a expressão das proteínas secretadas no citoplasma de variedades resistentes (Shan *et al.*, 2004; Vleeshouwers *et al.*, 2008). As proteínas efetoras, denominadas proteínas de avirulência, são reconhecidas por proteínas de resistência do hospedeiro e assim podem ser identificadas em bioensaios como moléculas que desencadeiam respostas dependentes da proteína R do hospedeiro, como a morte celular (reação de hipersensibilidade ou HR).

Diversos métodos podem ser utilizados para a análise de expressão transiente em plantas, como a agroinfiltração (Janssen & Gardner, 1990), a introdução de cassetes de expressão em células de plantas utilizando o bombardeamento (Sanford *et al.*, 1993), a introdução de cassetes de expressão em protoplastos de plantas via eletroporação (Guerche *et al.*, 1987) e a utilização de vetores virais (Jeong *et al.*, 2005). Outra técnica promissora é a translocação de proteínas efetoras utilizando o sistema EDV (*Effector Detector Vector*), baseado no sistema de secreção tipo III de bactérias (Sohn *et al.*, 2007). Para isso, é necessário o estabelecimento de protocolos de expressão transiente de genes candidatos, ou de suas proteínas, em folhas de genótipos de soja resistentes ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, a fim de se identificar genes que codificam proteínas secretadas que são reconhecidos pelas proteínas R, codificadas pelos diferentes genes de resistência correspondentes em soja.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a exequibilidade do uso da agroinfiltração e do sistema de secreção tipo III de *Pseudomonas*, para a avaliação funcional de genes candidatos a efetores de *P. pachyizi* em genótipos de soja resistentes a este fungo.

## **2- Revisão de Literatura**

### **2.1- A cultura da soja**

A soja é uma planta da família Fabaceae, originária da Ásia Oriental, onde é cultivada há centenas de anos. Hoje, muito diferente das suas ancestrais rasteiras, é amplamente cultivada, estando distribuída em todo o mundo. Seu grão é rico em proteínas e óleo, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, produção de biodiesel, entre outros (Embrapa, 2012).

No Brasil, o início do cultivo de soja para a produção comercial ocorreu por volta de 1935, no Rio Grande do Sul, cuja finalidade principal era sua utilização na alimentação de suínos. A sua produção tornou-se economicamente importante para o país na década de 50, sendo responsável pela ampliação da fronteira agrícola, principalmente na região Centro-Oeste e Norte. Isto só foi possível com o desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes condições de ambiente, viabilizando o cultivo em qualquer região do território nacional e transformando milhões de hectares improdutivos em áreas potenciais para o plantio (Sediyama *et al.*, 2009).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, possuindo destaque no agronegócio, com produção de 75,0 milhões de toneladas, numa área plantada de 24,2 milhões de hectares na safra 2010/2011 (Conab, 2012). As perspectivas futuras são de aumento da produção de grãos, entretanto, a expectativa de expansão da área de cultivo e aumento no rendimento é limitada por diversos fatores, dentre os quais se destacam os problemas de ordem fitossanitária (Embrapa, 2012). O plantio em larga escala da cultura favorece a disseminação e o aumento do número de casos de doenças, sendo a ferrugem asiática da soja (FAS) o principal problema da cultura.

### **2.2- A Ferrugem Asiática da Soja**

A FAS foi descrita pela primeira vez no Japão em 1902, causando dano em plantas de soja, e em 1914 foi registrada uma epidemia na Ásia. Em 1934, foi

detectada pela primeira vez na Austrália. Em 2002, foi relatada, de forma epidêmica, causando grandes prejuízos na África do Sul. No Brasil, em cultivos comerciais, foi detectada pela primeira vez na safra 2000/2001 e teve uma rápida expansão nas áreas produtoras de soja (Freire *et al.*, 2008). Na safra 2002/2003, a ferrugem atingiu mais de 90% da área de produção no Brasil, encontrando-se disseminada em todas as regiões produtoras na safra seguinte, exceto no estado de Roraima. Estima-se que somente na safra de 2010/2011 a FAS tenha causado prejuízos de cerca de US\$2,1 bilhões, ultrapassando US\$17,0 bilhões no somatório dos gastos desde a sua constatação no país (Consórcio Antiferrugem, 2011).

A FAS é considerada a principal doença na cultura da soja, sendo o maior limitante para o aumento da produção da cultura no Brasil e no mundo. A FAS tem como agente etiológico o fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, pertencente ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales, família Phakopsoraceae (Index Fungorum, 2012).

Existe outra espécie do gênero *Phakopsora* que ataca a cultura da soja, denominada *Phakopsora meibomiae* ou ferrugem americana. Esta espécie é nativa do continente americano, sendo seu primeiro relato feito em 1976, em Porto Rico, e a partir de então foi observada no Brasil, Colômbia e Costa Rica (Vakili & Bromfield, 1976; Bromfield, 1984). No campo, apenas com o uso de lupa, não é possível verificar as diferenças entre estas duas espécies de ferrugens. Essa diferenciação pode ser feita através da comparação entre a morfologia de télias ou teliósporos, ou através de análises moleculares, pela determinação da sequência de nucleotídeo da região ITS, que revelou mais de 99% de similaridade entre os isolados de *P. pachyrhizi* ou de *P. meibomiae* (Ono *et al.*, 1992). No entanto, observaram-se 80% de similaridade de sequência entre as duas espécies (Frederick *et al.*, 2002). A ferrugem americana ocorre em condições de temperaturas amenas e umidade relativa elevada, no entanto raramente causa perdas na produtividade da soja. A ferrugem só se tornou um problema para a produção de soja após a disseminação de *P. pachyrhizi*, considerada mais agressiva (Yorinori *et al.*, 2005).

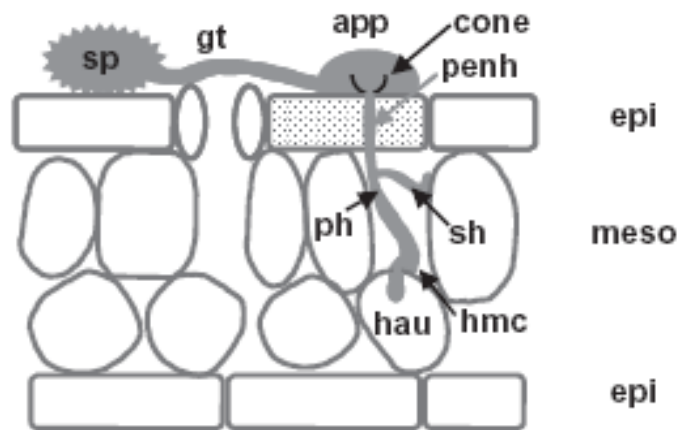
O fungo *P. pachyrhizi* possui uma ampla gama de hospedeiros, capaz de infectar 31 espécies em 17 gêneros no campo (Goellner *et al.*, 2010). Pode infectar a soja em todos os seus estádios de desenvolvimento, porém a fase crítica encontra-se no período próximo à floração. Inicialmente, a doença provoca descoloração e amarelecimento das folhas, e em condições favoráveis podem causar necrose e desfolha precoce das plantas (Carneiro, 2007). Estes sintomas resultam em uma perda de área fotossintética afetando o enchimento de grãos, o que pode prejudicar a formação de vagens, gerando vagens vazias, com menor peso de grãos, sementes verdes e perda da qualidade do produto. O dano acarretado pela FAS é variável, pois a severidade da doença varia de acordo com a safra e a região afetada, principalmente devido às condições climáticas favoráveis, podendo ocorrer uma redução drástica da produtividade, chegando a perda total da produção de grãos (Goellner *et al.*, 2010).

### **2.2.1- Ciclo de vida de *Phakopsora pachyrhizi***

O fungo *P. pachyrhizi* é considerado uma ferrugem microcíclica, pois no seu ciclo de vida só foram observados a formação de dois tipos de esporos até o momento. Os uredósporos são os esporos mais comumente encontrados nos campos de cultivos de soja e também em hospedeiros alternativos. Estas estruturas são produzidas de maneira abundante devido aos vários ciclos que o patógeno completa durante o ciclo da cultura e são de fácil dispersão pelo vento (Brown & Hovmoller, 2002; Nogueira, 2007; Tremblay *et al.*, 2009). Os teliósporos são observados no final do ciclo da cultura sob condições de temperaturas amenas e também em casas de vegetação. A germinação dos teliósporos e subsequente formação de basidiósporos nunca foram relatados na natureza, sendo somente observados sob condições de laboratório (Bromfield, 1984; Saksirirat & Hoppe, 1991b).

Em condições ambientais favoráveis, como temperatura entre 15 e 28°C e período mínimo de molhamento foliar de 6 horas, os uredósporos germinam produzindo um tubo germinativo. Este tubo forma em sua extremidade uma estrutura globosa, denominada apressório (Figura 1). *P. pachyrhizi* penetra

diretamente no tecido foliar através da cutícula, onde a hifa de penetração cresce através da célula epidérmica e atinge o espaço intercelular, sendo separada da hifa primária que emerge por um septo. A hifa primária se ramifica formando hifas secundárias e, finalmente, as células mãe do haustório diferenciam-se nos locais de contato com células do mesófilo (Figura 1). De 24 a 48h após a deposição dos uredósporos é observada a formação do haustório, e no período de quatro a cinco dias após a infecção, já é possível visualizar os sintomas e seis a oito dias após a infecção é possível visualizar as urédias, onde os uredósporos são produzidos, principalmente na face abaxial das folhas (Marchetti *et al.*, 1976; Koch *et al.*, 1983; Melching *et al.*, 1989, Tremblay *et al.*, 2009; Goellner *et al.*, 2010).



**Figura 1-** Estágios do desenvolvimento inicial de *P. pachyrhizi* durante sua interação com a planta hospedeira. O uredósporo (sp) germina produzindo um tubo germinativo (gt) que cresce formando, em sua extremidade, o apressório (app). Dentro do apressório é formada uma estrutura afunilada, denominada de cone apressorial (cone), que origina a hifa de penetração (penh) que atravessa a célula epidérmica (epi). Esta célula se desorganiza, e morre (pontilhado). Já no espaço intercelular do mesófilo (meso), a hifa primária (ph) é separada da hifa de penetração por um septo e se ramifica formando a hifa secundária (sh). Em contato com células do mesófilo, a hifa secundária se diferencia formando a célula-mãe do haustório (hmc) que forma o haustório na célula do mesófilo (hau), estabelecendo uma relação biotrófica com o hospedeiro (Figura adaptada de Goellner *et al.*, 2009).

### 2.2.2- Métodos de controle da ferrugem asiática da soja

Vários métodos de controle são utilizados objetivando diminuir as perdas na produção de soja ocasionadas pela FAS. O controle é feito principalmente pela aplicação de fungicidas dos grupos dos triazóis e estrobilurinas, isoladamente ou em mistura (Miles *et al.*, 2007; Consórcio Antiferrugem, 2012). Contudo, a utilização de fungicidas aumenta o custo total da produção em aproximadamente 3,5% por aplicação, diminuindo o retorno econômico da cultura. Outro problema no uso de fungicidas é o seu uso indiscriminado que pode levar a uma perda de eficiência, como já foi relatado para os fungicidas do grupo dos triazóis (Consórcio Antiferrugem, 2012).

Outra estratégia utilizada no manejo desta doença é o “vazio sanitário”, que se trata da proibição por lei do cultivo da soja no período da entressafra, exceto em caso de cultivo para pesquisa científica e experimentos, com prévia autorização dos órgãos de defesa sanitária. A eliminação de plantas voluntárias da cultura nos campos de cultivo e adjacências também é exigida (Consórcio Antiferrugem, 2011). Assim, o “vazio sanitário”, visa à redução do inóculo inicial do patógeno e o atraso do início da epidemia. Esta medida começou a ser adotada em 2006 nos estados de Mato Grosso e Goiás, e a partir de 2008 tornou-se obrigatória nos seguintes estados: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins (Carneiro, 2007). De acordo com o Consórcio Antiferrugem, a adoção do “vazio sanitário” proporcionou aos sojicultores do estado de Mato Grosso uma economia de R\$700 milhões, apenas na safra 2007/2008, pela redução no uso de fungicidas.

Outras medidas visando o manejo da FAS consistem na utilização de cultivares precoce e na semeadura no início da época indicada para cada região, com o objetivo de escapar do período de maior risco para a ocorrência da doença e evitar que a cultura fique exposta por mais tempo no campo; uso de densidades de plantio que favoreçam o bom arejamento foliar e a maior penetração dos fungicidas no interior do dossel da cultura; monitoramento da lavoura desde o início do crescimento das plantas, principalmente na época de floração; e na

manutenção de um equilíbrio nutricional das plantas (Consórcio Antiferrugem, 2011).

Embora o controle químico ainda seja a principal maneira de reduzir as perdas provocadas pela FAS, a utilização de variedades de soja resistentes ou tolerantes à ferrugem compreende a melhor alternativa para o controle da doença por reduzir os custos de produção, facilitar o manejo da cultura e reduzir o impacto ambiental do uso de fungicidas (Garcia *et al.*, 2008).

Em acessos de bancos de germoplasmas de soja já foram identificados cinco locos gênicos denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp5* que conferem resistência à ferrugem asiática da soja (Hidayat & Somaatmadja, 1977; McLean & Byth, 1980; Bromfield & Hartwig, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983; Hartwig, 1986; Garcia *et al.*, 2008). No loco *Rpp1* foram descritos dois alelos, *Rpp1* e *Rpp1b*, associado a resistência à *P. pachyrhizi* (Chakraborty *et al.*, 2009) e o loco *Rpp5* contém dois alelos dominantes e um recessivo de resistência (Garcia *et al.*, 2008).

A resistência contra *P. pachyrhizi* conferida por um único gene de resistência não tem se mostrado durável no campo. No Brasil, a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3* foi suplantada logo no segundo ano após a ferrugem asiática ter sido detectada no país, permanecendo efetiva apenas a resistência conferida pelos genes *Rpp2* e *Rpp4* (Hartman *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008). Dados atuais sugerem suplantação dos genes *Rpp2* e *Rpp4* em alguns locais de plantio, como Londrina-PR e Passo Fundo-RS (Soares *et al.*, 2009a).

Atualmente está disponível no mercado quatro cultivares resistentes à FAS: TMG 801, TMG 803 e TMG 7188 RR da Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, Fundação MT, e da Tropical Melhoramento Genético (TMG); e a cultivar BRSGO 7560, desenvolvida pela Embrapa Soja (Fundação Mato Grosso, 2012; Embrapa, 2012). Tem-se recomendado o uso dessas variedades em associação com aplicações de fungicidas, para evitar a rápida suplantação da resistência, facilitando também o manejo da doença.

Existem três fenótipos de infecção de *P. pachyrhizi* em plantas hospedeiras: lesões “TAN” que são lesões castanho-claro com esporulação

abundante, lesões “RB” que possuem coloração castanha avermelhadas com pouca ou nenhuma esporulação, observadas em cultivares resistentes, e “imune”, caracterizada pela ausência de sintomas macroscópicos da doença (Bromfield, 1984; Pham *et al.*, 2009; Miles *et al.*, 2011).

Avaliando a resistência de 33 genótipos de soja, Costa (2010), verificou que o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* foi avirulento nos genótipos PI 594538-A, PI 230970, PI 459025, PI 200487, PI 471904, PI 587880-A, PI 594767-A, PI 561356, PI 587905 e PI 594754. A resistência desses genótipos se manifestou na forma de lesões do tipo RB ou imunidade. Assim, estes resultados indicam que o isolado PPUFV02 provavelmente apresenta genes *Avr* correspondentes aos genes *R* presentes nos genótipos de soja mencionados, de acordo com a teoria gene a gene de Flor, que prediz que para gene de resistência no hospedeiro, existe um gene de avirulência correspondente no patógeno (Flor, 1942).

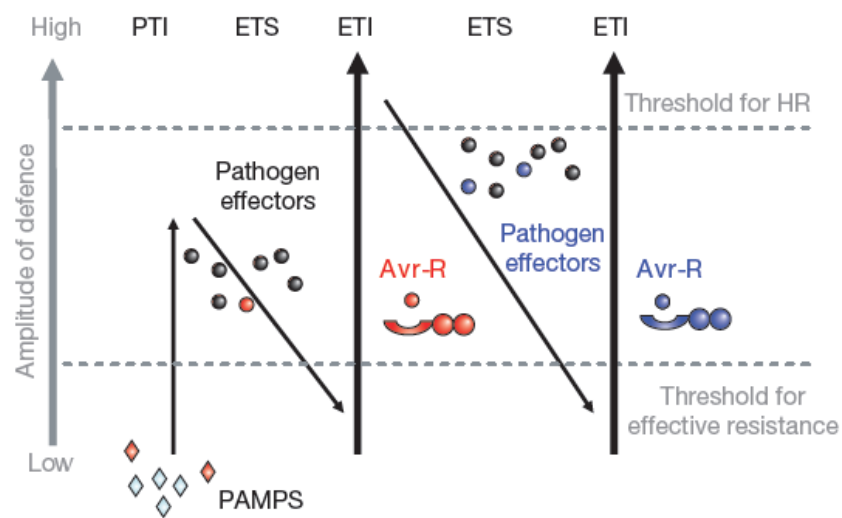
### **2.3- O sistema imune vegetal**

Fitopatógenos como bactérias, fungos, oomicetos e nematóides possuem diversas estratégias de ataque ao hospedeiro, sendo que, independente da estratégia adaptativa de qualquer patógeno, estes secretam proteínas (fatores de virulência) e outras moléculas para dentro das células dos seus respectivos hospedeiros com a função de suprimir as repostas de defesa da planta, permitindo o estabelecimento da colonização parasítica (Abramovitch *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Block *et al.*, 2008). Por outro lado, em resposta à infecção, as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, sistemas complexos de defesa que visam conter o sucesso do patógeno (Dodds & Rathjen, 2010).

As plantas são organismos sésseis que não podem se mover para evitar condições adversas, sejam elas abióticas ou bióticas, e também não possuem um sistema imune adaptativo como os mamíferos, ou seja, a defesa das plantas baseia-se no sistema imune inato (Dangl & Jones, 2001; Jones & Dangl, 2006).

O modelo “zigzag” (Figura 2) proposto por Jones & Dangl (2006) propõe a existência de duas linhas de defesa na planta. A primeira utiliza proteínas

receptoras localizadas na membrana plasmática de células vegetais (PRRs) que reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs). Trata-se de uma defesa basal, conhecida como imunidade desencadeada por PAMPs, ou PTI. Esta primeira linha de defesa reconhece características microbianas conservadas, que normalmente possuem funções estruturais ou enzimáticas fundamentais para o desenvolvimento do microorganismo, como a quitina e a flagelina (De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006). A quitina é o principal componente estrutural de parede celular de fungos (De Wit *et al.*, 2009; Stergiopoulos & De Wit, 2009), e a flagelina é uma subunidade protéica que compõe o filamento flagelar, elemento importante na virulência de fitobactérias (Zipfel & Felix, 2005).



**Figura 2.** Modelo “zigzag” ilustrando o sistema imune vegetal com duas linhas de defesa. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; PTI: imunidade desencadeada por PAMPs; ETS: suscetibilidade desencadeada por efetores; Avr-R: reconhecimento da proteína de avirulência por proteínas de resistência; ETI: imunidade desencadeada por efetores (Jones & Dangl, 2006).

Os patógenos que foram capazes de suplantar a defesa basal das plantas utilizam moléculas efetoras que suprimem PTI e contribuem para a virulência do patógeno, resultando em uma suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Em contrapartida, em uma segunda linha de defesa, a planta responde com um sistema especializado de defesa baseado no reconhecimento direto ou indireto de

efetores pelas proteínas codificadas por genes *R*, resultando na imunidade desencadeada por efetores (ETI) (De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006).

Flor (1942), com base em estudos genéticos no patossistema linho-*Melampsora lini*, elaborou a teoria gene-a-gene. De acordo com esta teoria, para cada gene dominante de avirulência (*Avr*) no patógeno, existe um gene de resistência dominante (*R*) correspondente no hospedeiro e a interação do produto destes genes resulta em respostas de defesa, dentre elas a morte celular localizada, conhecida pela denominação de reação de hipersensibilidade ou HR. Bioquimicamente, esta teoria é interpretada pelo modelo receptor – ligante, que prediz que as proteínas do gene *R* de plantas reconhecem diretamente as proteínas *Avr* do patógeno (Van der Biezen & Jones, 1998).

Um segundo modelo de reconhecimento é conhecido como “modelo guarda”, que propõe um reconhecimento indireto entre produtos do gene *R* e *Avr* (Stergiopoulos & de Wit, 2009). De acordo com este modelo, as proteínas *R* atuam monitorando a presença e modificações de proteínas alvos pelos efetores do patógeno. Estudos nesta área mostram que este é o modelo que se aplica à maioria dos estudos de interação já descritos. Um exemplo deste modelo é o reconhecimento indireto entre as proteínas *Avr2/Cf-2* de *Cladosporium fulvum* e tomate, respectivamente. Quando a proteína *Cf-2* está presente na planta, o reconhecimento da proteína *Avr2* é mediado por *Rcr-3*. O complexo *Rcr-3/Avr2* permite que *Cf-2* desencadeie a resposta de defesa (Rooney *et al.*, 2005; Stergiopoulos & de Wit, 2009).

### **2.3.1- Proteínas efetoras de fitopatógenos**

Efetores são definidos como fatores de virulência que alteram a estrutura e função das células hospedeiras promovendo a infecção, além de melhorar o potencial de colonização do tecido celular, sobrevivência e reprodução dos patógenos; ou ainda podem desencadear respostas de defesa em função do reconhecimento por proteínas *R* (Torto *et al.*, 2003; Kamoun, 2009; Yin & Hulbert, 2010; Oliva *et al.*, 2010).

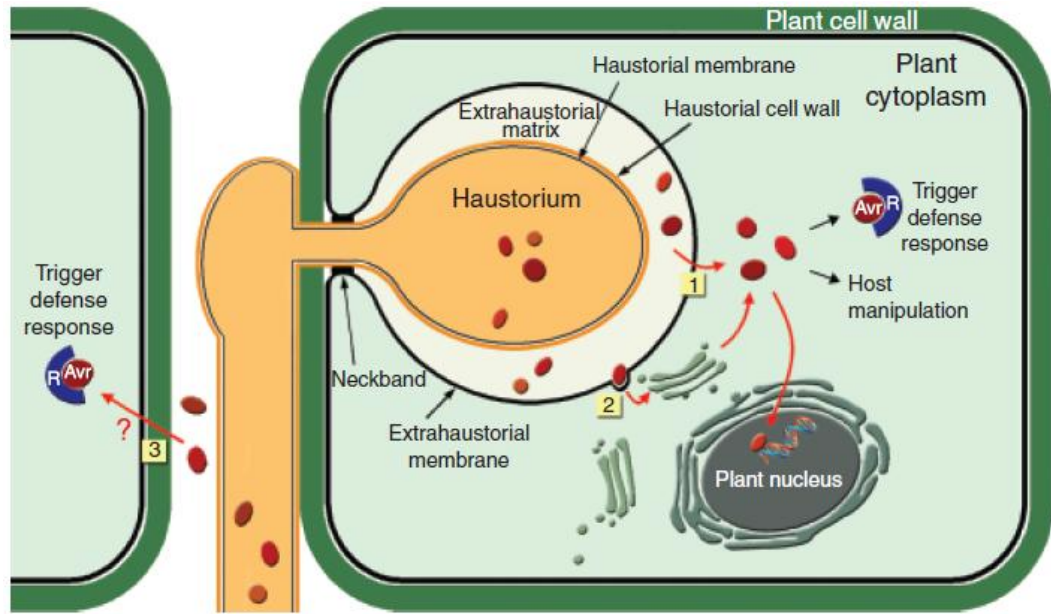
As proteínas efetoras que são reconhecidas pelos produtos dos genes *R* são denominadas proteínas de avirulência, e os seus genes correspondentes, genes *Avr*. Desde as pesquisas pioneiras de Flor, vários estudos têm sido feitos, e vários genes *R* e seus genes *Avr* correspondentes têm sido identificados (De Wit *et al.*, 2009). Os primeiros genes que codificam para proteínas *Avr* de bactéria, fungo e oomiceto foram relatados em 1984, 1991 e 2004, respectivamente (Staskawicz *et al.*, 1984; van Kan *et al.*, 1991; Shan *et al.*, 2004; De Wit *et al.*, 2009).

As proteínas efetoras podem ser divididas em duas classes distintas: efetores apoplásticos, que são secretados no espaço extracelular da planta, e efetores citoplasmáticos, que são translocados para dentro da célula do hospedeiro (Kamoun, 2006). Normalmente a predição de localização celular das proteínas *Avr* coincide com o local onde fica localizada a proteína *R* correspondente (van den Hooven, 1999). Como exemplo de efetores apoplásticos pode-se citar o grupo de genes *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* e *Avr9* que codificam pequenas proteínas ricas em cisteína, secretadas durante a infecção de tomate por *C. fulvum* (Stergiopoulos & de Wit, 2009). Os aminoácidos cisteína formam pontes dissulfeto que proporcionam uma conformação que dá maior estabilidade à proteína no apoplasto, uma região rica em proteases (Luderer *et al.*, 2002). Os efetores citoplasmáticos de oomicetos possuem um domínio de aminoácidos [RxLR – dEER] localizado *downstream* ao peptídeo sinal envolvido na sua translocação para o citoplasma das plantas hospedeiras. Este domínio RxLR (onde “x” representa qualquer resíduo de aminoácido) é necessário e suficiente para mediar a entrada de efetores em células do hospedeiro na ausência do oomiceto, indicando que a translocação ocorre independentemente de qualquer maquinaria do patógeno (Panstruga & Dodds, 2009). Whisson *et al.* (2007) demonstraram que o domínio RxLR não é requerido para a secreção do efector *Avr3a* a partir do haustório de *Phytophthora infestans*, porém é necessário para translocação do efector do haustório para células de batata (Whisson *et al.*, 2007; Grouffaud *et al.*, 2008).

Em contraste com os efetores de oomicetos, os efetores de fungos filamentosos e biotróficos não contêm o domínio RxLR-EER, nem outros domínios conservados, mas apresentam sinal de secreção N-terminal (Catanzariti

*et al.*, 2006). Porém, há exceções como os genes *AVRa10* e *AVRk1* de *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, que codificam proteínas Avr sem peptídeo sinal de secreção (Ridout *et al.*, 2006).

As ferrugens, durante sua interação com a planta, desenvolveram uma estrutura especializada para absorção de nutrientes conhecida como haustório, que é uma hifa altamente especializada que penetra a parede celular vegetal e cresce dentro da célula do hospedeiro. Esta estrutura é circundada por uma membrana plasmática e parede celular. Todavia, ela não é formada diretamente no citoplasma da célula vegetal. Ao invés disso, a membrana plasmática da célula do hospedeiro invagina e forma uma membrana extra-haustorial ao redor do haustório. Na interface entre a parede celular do haustório e a membrana extra-haustorial é formada a matrix extra-haustorial (Catanzariti *et al.*, 2007; Dodds *et al.*, 2009) (Figura 3). Além do papel na absorção de nutrientes a partir do hospedeiro, os haustórios estão envolvidos no redirecionamento do metabolismo vegetal e supressão da resposta de defesa do hospedeiro (Voegelé & Mendgen, 2003). Desta forma, o haustório é essencial para o estabelecimento da relação parasitária, por onde pode ser verificada a secreção de proteínas efetoras na matriz extra-haustorial, sendo algumas destas proteínas translocadas para o interior da célula do hospedeiro (Dodds *et al.*, 2009).



**Figura 3-** Diagrama esquemático da interface haustório-hospedeiro. O esquema ilustra o haustório de ferrugem dentro da célula hospedeira mostrando a membrana extra-haustorial, a matriz extra-haustorial e um discreto compartimento conhecido como “neckband”. As proteínas efetoras são secretadas a partir do haustório para a matrix extra-haustorial. Um subconjunto de proteínas é transportado para dentro da célula hospedeira atravessando diretamente a membrana extra-haustorial (1), ou através de vesículas do sistema de endomembranas (2). Uma vez dentro do citoplasma do hospedeiro, as proteínas efetoras podem manipular as defesas do hospedeiro ou serem reconhecidas por proteínas *R* do hospedeiro, desencadeando resposta de defesa. Outros efetores, chamados efetores tipo TAL (“Transcription Activator-like effectors”) podem ser direcionados para o núcleo do hospedeiro, onde podem alterar a transcrição. Alguns efetores podem ser secretados a partir da hifa para o apoplasto e podem entrar na célula hospedeira por um mecanismo ainda desconhecido (3), e desencadear resposta de defesa caso seja reconhecido por proteínas de resistência (Catanzariti *et al.*, 2007).

A maioria das proteínas dos genes *R* já caracterizados que conferem resistência a fungos causadores de ferrugens, como *Puccinia* e *Melampsora*, possui predição de localização citoplasmática, indicando que os efetores correspondentes são efetores citoplasmáticos, produzidos pelos haustórios (Yin & Hulbert, 2010). Na ferrugem *M. lini*, quatro genes *Avr* foram clonados (*AvrL567*, *AvrM*, *AvrPI23* e *AvrP4*). Estes codificam proteínas que, ao serem expressas transientemente em plantas de linho contendo o gene *R* citoplasmático correspondente, induzem a HR, indicando a sua translocação para o citoplasma

durante a interação do patógeno com a planta hospedeira (Stergiopoulos & de Wit, 2009).

Em estudos com a interação soja-*P. pachyrhizi* efetuados por Zaramela (2011) foram identificados genes de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas. Através da construção e triagem de uma biblioteca YST, selecionou-se por meio de ferramentas de bioinformática aqueles que apresentavam cDNA de origem fúngica e obteve-se a sequência completa (cDNA) dos genes identificados. Todavia, ainda não foram identificadas as proteínas efetoras (Avr) da ferrugem *P. pachyrhizi* reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes *Rpp* de soja. As análises das sequências completas de cDNA obtidas por Zaramela (2011) podem favorecer o estudo do papel de diferentes efetores em plantas de soja, contribuindo para o melhor entendimento de processos moleculares em plantas e auxiliar no desenvolvimento de estratégias no manejo da FAS.

#### **2.4- Métodos de análise funcional de proteínas efetoras**

O método de análise funcional de proteínas efetoras por meio da expressão transiente de genes em plantas é um método promissor na análise da interação entre proteínas de resistência de hospedeiros e proteínas de avirulência de patógenos (Frederick *et al.*, 1998; Kapila *et al.*, 1997; Scofield *et al.*, 1996). Existem diversos métodos para a análise de expressão transiente em plantas, como a infiltração de espécies de *Agrobacterium* em tecidos foliares (Janssen & Gardner, 1990), a introdução do DNA em células de plantas utilizando o bombardeamento de partículas (Sanford *et al.*, 1993), a introdução de cassetes de expressão em protoplastos de plantas via eletroporação (Guerche *et al.*, 1987) e a utilização de vetores virais (Jeong *et al.*, 2005).

A técnica de expressão transiente vem sendo bastante utilizada por possuir a vantagem de avaliar a expressão gênica em um curto período de tempo, e ainda não depender da regeneração de células transformadas para avaliar a transferência e função do produto do gene (Kapila *et al.*, 1997).

A soja é uma espécie de planta recalcitrante para a regeneração de protoplastos e também não existe ainda um sistema de transformação para *P.*

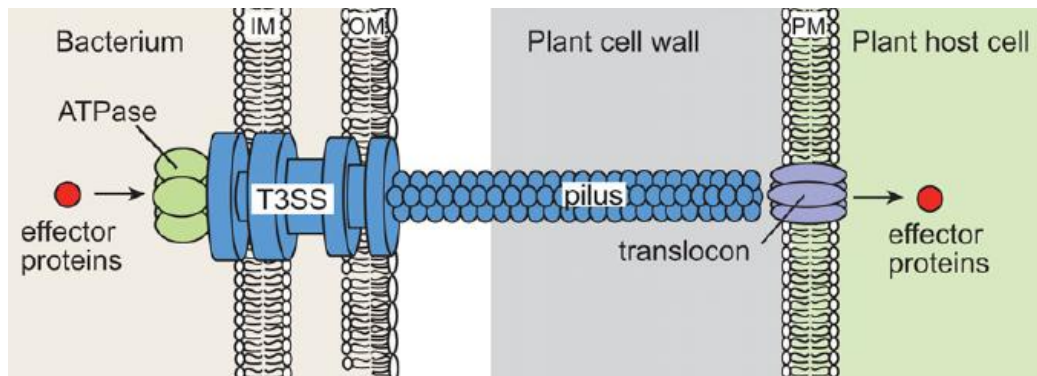
*pachyrhizi* que permite a análise transiente funcional de genes do patógeno. Sendo assim, uma estratégia para identificar as proteínas Avr desse fungo é a expressão das proteínas Avr no citoplasma de variedades resistentes e a possível observação do desencadeamento da resposta de hipersensibilidade. Para isso, é necessário o estabelecimento de protocolos de expressão transiente de genes candidatos em folhas de genótipos de soja resistentes à *P. pachyrhizi*, a fim de se identificar genes que codificam efetores que são reconhecidos pelas proteínas R, estas codificadas pelos diferentes genes de resistência correspondentes em soja.

A agroinfiltração é considerada uma alternativa interessante, onde os genes que codificam para as proteínas secretadas são transferidos para cassetes de expressão baseados no T-DNA, de forma que a expressão dos genes seja direcionada pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Vleeshouwers *et al.*, 2006). Este método foi utilizado com sucesso para estudar genes Avr de diversos organismos, incluindo *Tobacco mosaic virus* (Erickson *et al.*, 1999), *Cladosporium fulvum* (Van der Hoorn *et al.*, 2000) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Tang *et al.*, 1996). Este método possui a vantagem de acomodar grandes genes, além da vantagem de *Agrobacterium* possuir uma ampla gama de hospedeiros, sendo funcional em diversas espécies de plantas, tais como tabaco, batata, tomate, alface, ervilha, uva, e *Arabidopsis* (Mestre *et al.*, 2000; Van der Hoorn *et al.*, 2000; Wroblewski *et al.*, 2005; Santos- Rosa *et al.*, 2008).

Outro método promissor na análise funcional de proteínas efetoras é a utilização do sistema EDV (*Effector Detector Vector*) baseado no sistema de secreção tipo III de bactérias (Sohn *et al.*, 2007). Diversas bactérias Gram-negativas possuem sistemas especializados de secreção que realizam o transporte de moléculas, dentre eles destaca-se o SST3 (Greenberg & Vinatzer, 2003). Os genes que codificam as proteínas do SST3 são denominados genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity genes*) por serem necessários para a patogenicidade e indução das reações de hipersensibilidade em plantas hospedeiras e não hospedeiras, respectivamente (Szurek *et al.*, 2002; Abramovitch & Martin, 2004; Bittel & Robatzek, 2007).

O SST3 é um aparato molecular semelhante a uma agulha que atravessa a membrana interna e externa da célula bacteriana (Figura 4) que é capaz de

translocar proteínas diretamente para o citoplasma da planta. A arquitetura deste sistema se assemelha ao filamento flagelar, utilizado para locomoção de bactérias. Ambos consistem de uma estrutura de corpo basal conservado que resulta em um conduto entre a membrana externa da célula bacteriana e a interface citoplasmática e (Kubori *et al.*, 2000; Cambronne & Roy, 2006).



**Figura 4-** Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras pelo SST3. O corpo basal do SST3 se estende através da membrana interna (IM) e da membrana externa (OM) conectando-se a um pílus extracelular em forma de agulha que atravessa a parede celular vegetal, por onde são transportados os efetores até o interior da membrana da célula do hospedeiro (PM). Associado ao pílus encontra-se o complexo de translocação (ilíaco) que forma um canal proteico permitindo a passagem dos efetores para o citosol. Um gerador de energia (verde) faz com que proteínas efetoras sejam transportadas para a célula do hospedeiro (Büttner & He, 2009).

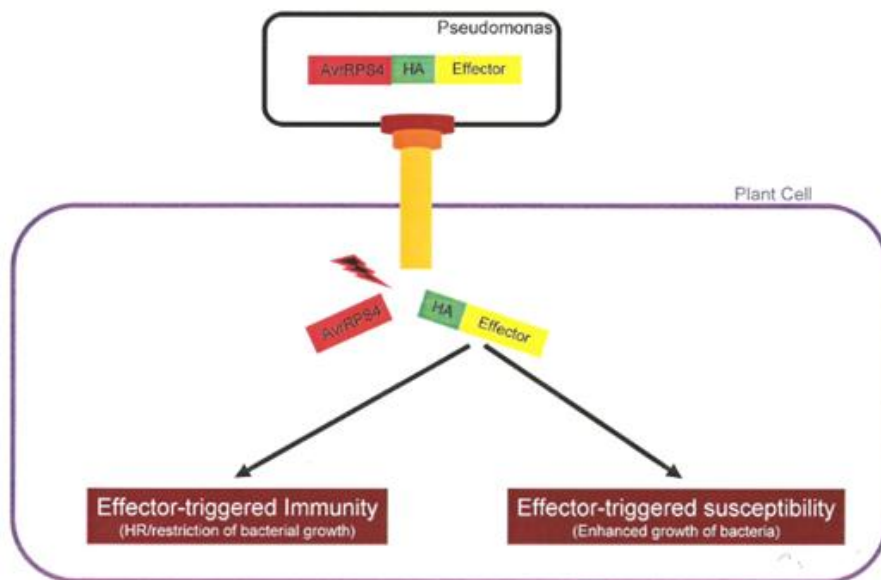
O SST3 está entre os sistemas secreção mais complexo que se conhece atualmente. Este é composto por mais de 20 proteínas, incluindo um grupo de proteínas integrais da membrana, chaperonas e diversas proteínas acessórias altamente conservadas (Marlovits *et al.*, 2004). Estímulos ambientais geralmente derivados do contato do SST3 com a célula do hospedeiro são necessários para a ativação da translocação de proteínas efetoras (Kubori *et al.*, 2000).

Rentel *et al.* (2008) desenvolveram um sistema eficiente para testar genes efetores putativos utilizando o SST3 de *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000. A proteína efetora, denominada ATR13, de *Hyaloperonospora parasitica*, um oomiceto patógeno de *Arabidopsis*, foi fusionada com a sequência do peptídeo que sinaliza a secreção pelo SST3 da proteína de avirulência codificada pelo gene *avrRpm1* no vetor pVSP61, que é capaz de replicar em *P. syringae* pv. *tomato*. A

translocação de ATR13 via SST3 foi capaz de desencadear a HR em plantas contendo o gene que codifica a proteína de resistência RPP13.

Outros estudos também com efetores de *H. parasitica* em *Arabidopsis*, mostraram que o sistema EDV é capaz de translocar proteínas desse oomiceto para células de folhas do hospedeiro. Este sistema EDV permite a expressão de proteínas de interesse fusionadas com sequências-sinais de secreção via SST3, em *P. syringae*, visando a sua posterior translocação para o citosol do hospedeiro (Sohn *et al.*, 2007).

O esquema abaixo (Figura 5) ilustra a translocação da proteína efetora para o citoplasma vegetal baseado no sistema de translocação mediado por SST3 de bactérias contendo o vetor pEDV:



**Figura 5-** Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras, codificadas por genes clonados no vetor pEDV, para dentro da célula do hospedeiro, mediado por SST3. Após a translocação da proteína, esta pode ser reconhecida por proteínas R e desencadear uma resposta de defesa, ou a proteína pode não ser reconhecida e contribuir para o aumento da severidade da doença na planta.

Assim como foi usado para efetores de oomicetos, o sistema EDV pode ser testado também para efetores de fungos, apresentando ainda diversos benefícios, como a existência de uma ampla gama de fitobactérias que são relativamente fáceis de serem manipuladas e estirpes mutantes sem um ou mais efetores do SST3 disponíveis (Sohn *et al.*, 2007).

### **3- Objetivos**

#### **3.1- Objetivo geral**

Avaliar a exequibilidade do uso da agroinfiltração e do sistema de secreção tipo III de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* raça 4 (Psg4), para a avaliação funcional de genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* em genótipos de soja resistentes a este fungo.

#### **3.2- Objetivos específicos**

- i- Estabelecer um protocolo de análise de expressão transiente de genes em soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*;
- ii- Estabelecer um protocolo de análise de expressão transiente de proteínas secretadas pelo isolado PPUFV02 em soja, baseado no SST3 de Psg4;
- iii- Avaliar a atividade efetora de genes de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas utilizando os protocolos estabelecidos.

## **4- Material e Métodos**

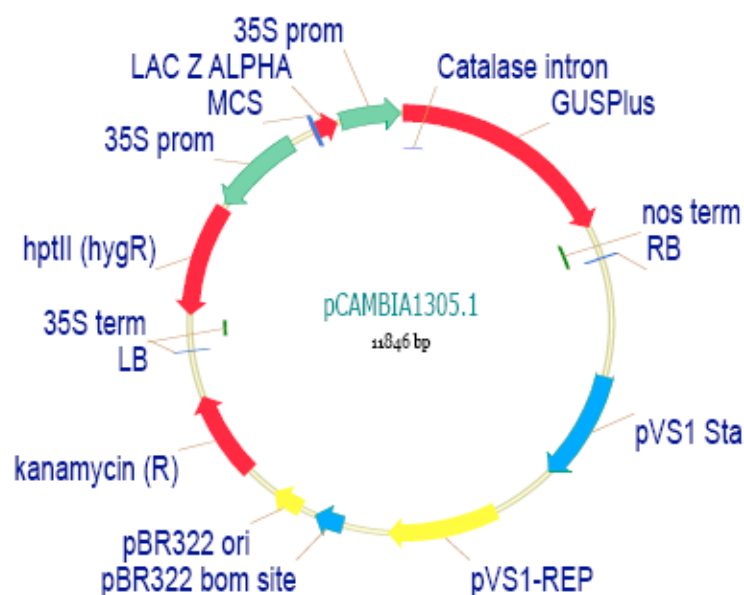
### **4.1- Análise da expressão transiente do gene repórter *GUSPlus* em soja e em tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

#### **4.1.1- Preparo das plantas de *Nicotiana tabacum* e de soja**

Sementes de *N. tabacum* cultivar Havana 425 foram semeadas em um vaso de 2L contendo substrato. Trinta dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas em vasos de 0,5L também contendo substrato. As sementes das cultivares de soja Conquista, CAC-1 e Bragg foram pré-germinadas em placas de Petri por 48h a temperatura ambiente para uma germinação mais uniforme, e transplantadas em vasos de 0,5L contendo solo e substrato na proporção de 1:1. As plantas de tabaco e de soja foram mantidas em casa de vegetação e utilizadas no ensaio de expressão transiente aos 21 dias após o plantio. Foram utilizadas plantas de soja no estágio fenológico V<sub>2</sub>.

#### **4.1.2- Estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor com o gene *GUSPlus***

Na agroinfiltração foi utilizada a estirpe de *A. tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) que é utilizada em estudos de transformação de soja (Dang & Wei, 2007). A estirpe EHA105 utilizada continha o vetor binário pCAMBIA1305.1 (Figura 6). Este vetor contém o gene *GUSPlus* com o íntron da catalase e o gene de resistência a higromicina (*hpt*) na região de T-DNA sob o controle do promotor CaMV35S. O gene *GUSPlus* foi originalmente isolado de espécies de *Staphylococcus*, a qual e codifica uma  $\beta$ -glucuronidase mais estável a altas temperaturas do que a codificada pelo gene *gus* isolado de *Escherichia coli* (CAMBIA, 2012). O gene *GUSPlus* contém o íntron na região codificadora para prevenir a expressão pelas células de *Agrobacterium*, permitindo comprovar que a atividade da  $\beta$ -glucuronidase detectada é resultado da expressão do gene nas células transformadas (Raveendar & Ignacimuthu, 2010).



**Figura 6-** Mapa do vetor binário pCAMBIA 1305.1 utilizado no estabelecimento de um protocolo de análise de expressão transiente de genes em soja mediada por *A. tumefaciens* (CAMBIA, 2012).

#### 4.1.3- Agroinfiltração

Células de *A. tumefaciens* EHA 105, mantidas a -80°C, sem a presença do vetor (controle negativo) e células contendo o vetor binário pCAMBIA 1305.1 foram plaqueadas no meio YEP sólido (Bactotripton 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%) contendo os antibióticos rifampicina (100 µg/mL) e rifampicina (100 µg/mL) mais canamicina (50 µg/mL), respectivamente. As placas foram incubadas a 28°C até a formação de colônias individuais.

O preparo da cultura de *Agrobacterium* foi efetuada como descrito por Liu *et al.* (2008) com as seguintes modificações. Uma única colônia de cada placa foi transferida para 10 ml de meio YEP líquido (Bactotripton 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5%, pH 5,6) contendo os respectivos antibióticos e incubadas de 14 a 16 horas a 28°C sob agitação de 280 rpm. Subsequentemente, foi utilizado 2,5 ml da cultura de *Agrobacterium* para inocular 250 ml de meio YEP líquido que foi mantido por 14 a 16 horas a 28°C, sob agitação de 200 rpm.

A seguir, as agrobactérias foram coletadas por centrifugação a 2000g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. As agrobactérias foram ressuspensas em 50 ml de solução de infiltração (MES 10 mM pH 5,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM).

Para a infiltração das folhas de tabaco, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para uma OD<sub>600</sub>= 0,4 (Kelley *et al.*, 2010). Adicionou-se acetoseringona a 100 µg.mL<sup>-1</sup> à suspensão de células que foi incubada por 2 horas no escuro, em temperatura ambiente, para indução dos genes *vir* (Manavella & Chan, 2009). O mesmo procedimento foi adotado no preparo da suspensão bacteriana para a infiltração das folhas de soja, sendo que a única diferença foi o acréscimo, imediatamente antes da agroinfiltração, do surfactante Silwet L-77 a 0,02% na suspensão de infiltração, a fim de facilitar a infiltração (Chen *et al.*, 2010).

Nas plantas de tabaco, a infiltração foi realizada com o auxílio de seringas de plástico de 5 mL, sem agulha, pressionando o limbo foliar para a infiltração da suspensão bacteriana.

A soja foi inoculada por infiltração como descrito por Zou *et al.* (2005), efetuando as devidas adaptações. As plantas foram totalmente submersas na suspensão de infiltração e submetidas à pressão a vácuo. A pressão foi liberada rapidamente, certificando-se de que todo o mesófilo foliar estivesse completamente infiltrado. Em seguida as plantas de soja foram cobertas com sacos plásticos, para manutenção de câmara úmida, por 24 horas. Foram utilizadas três repetições por genótipo de soja agroinfiltrado.

Após a infiltração, todas as plantas, tanto as de tabaco quanto as de soja, foram mantidas sob temperatura de aproximadamente 22°C por três dias, durante os quais se efetuou a coleta dos discos foliares para a realização do teste histoquímico (Manavella & Chan, 2009).

Como controles negativos foram utilizadas plantas com a solução de infiltração e com a *Agrobacterium* EHA105 sem o vetor binário.

#### **4.1.4- Avaliação da expressão do gene repórter *GUSPlus***

Para avaliar a expressão do gene repórter *GUSPlus*, foi realizado a análise histoquímica das folhas de tabaco e de soja previamente agroinfiltradas, como descrito por Manavella & Chan (2009) com as devidas modificações. Os discos foliares de ambas as plantas foram coletados as 48 e 72 horas após a infiltração (hpi) e imersos em solução de tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2M +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M, pH7,0) contendo o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo (X-gluc). Os discos foliares da soja foram submetidos ao vácuo por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, os discos foliares de soja e de tabaco foram incubados a 37°C no escuro por 16 horas e posteriormente transferidos para um recipiente com etanol absoluto para bloquear a reação. Os tecidos foliares foram mantidos em etanol por 24h para a retirada da clorofila e melhor visualização da coloração azul em folhas onde foi comprovada a expressão do gene *GUSPlus*.

#### **4.2- Estabelecimento de um protocolo de análise funcional de proteínas secretadas pelo isolado PPUFV02 em soja, baseado no SST3 de Psg4**

##### **4.2.1- Material vegetal**

As plantas de soja foram conduzidas como descrito no item 4.1.1. com a diferença de que foram utilizados 14 genótipos de soja (PI 200487, PI 230970, PI 459025, PI 471904, PI 561356, PI 587880-A, PI 587886, PI 587905, PI 594538-A, PI 594754, PI 594767-A, Shiranui, Willians 82 e Conquista) que foram mantidas em casa de vegetação até que atingissem o estágio V2 (aproximadamente 21 dias após plantio) e foram pré-incubadas em câmara de nevoeiro por 24h antes da inoculação.

#### **4.2.2- Preparo da suspensão bacteriana de Psg4 e inoculação por infiltração a vácuo para a avaliação da suscetibilidade dos genótipos de soja**

As células de Psg4 foram estriadas em placas de meio King B sólido contendo o antibiótico rifampicina (100µg/mL) e crescidas a 28 °C por 24h. As células foram ressuspensas em solução salina de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub> a 10mM) gelada e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 50 mL de solução salina. Foram efetuadas inoculações com as concentrações da suspensão bacteriana para infiltração em soja ajustadas para as OD<sub>600</sub>= 0,5; 0,1 e 0,01 adicionando o surfactante Silwet L-77 na concentração final de 0,02%.

A infiltração a vácuo prosseguiu igualmente como foi descrito no item 4.1.3, sendo as plantas mantidas em uma câmara de 26 °C até o final da avaliação. Os sintomas foram avaliados as 24, 48 e 72 hpi.

O tratamento controle consistiu de plantas de soja infiltradas com a solução salina com a adição de Silwet L-77 a 0,02%.

#### **4.2.3- Preparo de células eletrocompetentes, transformação de Psg4 com o vetor pVSP61 e posterior inoculação de plantas de soja**

A bactéria Psg4 foi inoculada, a partir do estoque a -80 °C, em meio King B sólido contendo o antibiótico rifampicina (100µg/mL) e crescidas a 28 °C. Para o preparo de células eletrocompetentes, foi inoculado, a partir da placa estriada, 5 mL de meio King B que foi incubado *overnight* a 28 °C sob agitação de 280rpm. Em seguida foi inoculado 400 mL de meio King B que foi incubado a 28 °C até atingir uma OD<sub>600</sub>= 0,5. A suspensão celular foi transferida para tubos de 250mL estéreis e mantidas no gelo por 30 minutos. Logo após, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes em água milli-Q estéril gelada. A suspensão bacteriana foi novamente centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o precipitado foi ressuspendido em glicerol 10%. As células foram aliqüotadas em tubos de microcentrífuga e armazenadas a -80 °C.

As células de Psg4 foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo pVSP61 contendo o gene *avrB* (Ashfield *et al.*, 1995; Rentel *et al.*, 2008). As células transformadas foram selecionadas em meio seletivo King B com os antibióticos rifampicina (100µg/mL) e canamicina (50µg/mL) a 28°C. O plasmídeo pVSP61 contendo o gene *avrB* foi cedido gentilmente por Alam Bogdanove, da Iowa State University.

O preparo da suspensão de infiltração da construção pVSP61-avrB foi feita de acordo com o item 4.2.2, com a diferença de que a bactéria foi estriada em meio King B sólido contendo os antibióticos rifampicina (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL).

A concentração da suspensão de infiltração foi ajustada para as OD<sub>600</sub>= 0,5; 0,1 e 0,01 e a infiltração foi realizada a vácuo, como descrito no item 4.2.2 sendo as plantas posteriormente mantidas em uma câmara de 26 °C até o final da avaliação. A avaliação do desencadeamento de resposta de defesa foi realizada as 24 e 48 hpi.

O tratamento utilizado como controle negativo foi o mesmo descrito no item anterior.

### **4.3- Avaliação da atividade efetora de proteínas candidatas de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas**

#### **4.3.1- Clonagem e transformação de Psg4 com o vetor pEDV6 contendo os genes que codificam para proteínas secretadas na interação soja - *P. pachyrhizi***

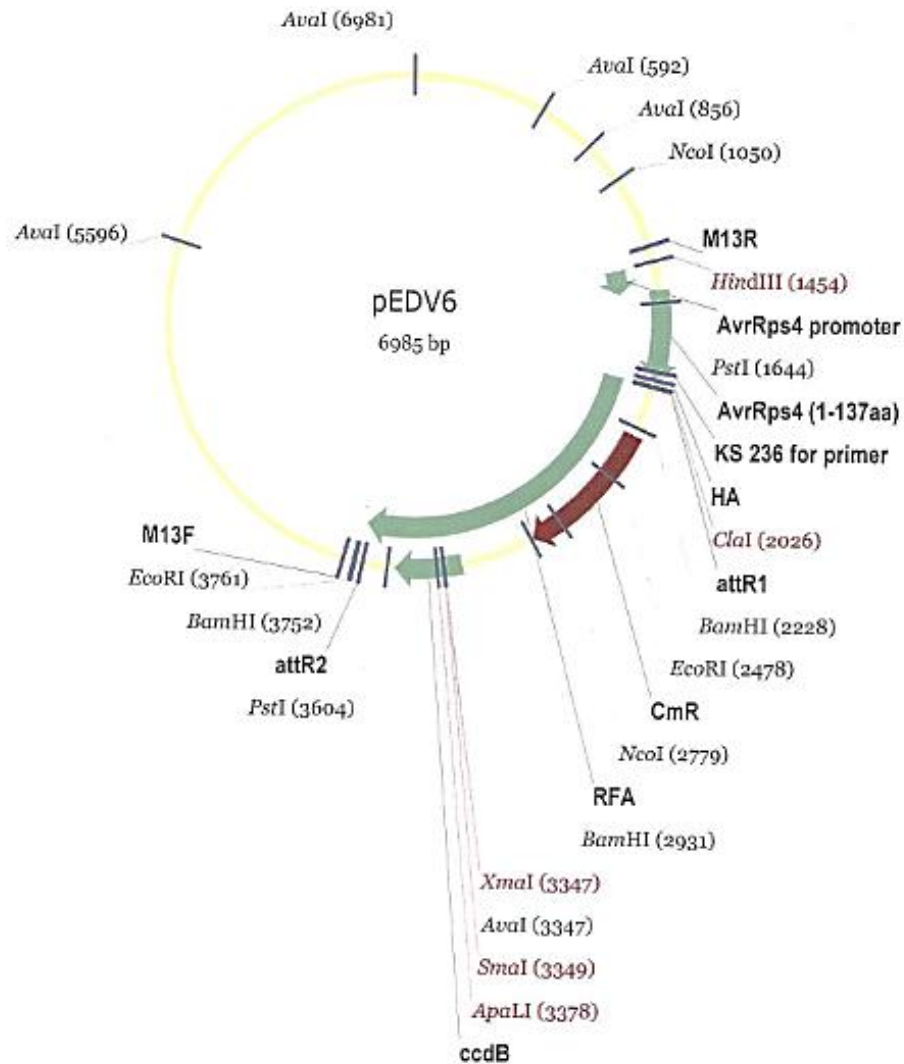
No total, 64 sequências de genes que codificam para proteínas secretadas pelo isolado PPUFV02 do fungo *P. pachyrhizi* foram identificadas por meio da utilização do sistema de armadilha de sinal de secreção e análises de bioinformática (Zaramela, 2011). Destas, 29 apresentaram ORFs completas e 12 sequências completas foram selecionadas para a análise funcional em soja utilizando a translocação mediada pelo SST3: PHPA\_RSP\_12, PHPA\_RSP\_65, PHPA\_RSP\_67, PHPA\_RSP\_70, PHPA\_RSP\_71, PHPA\_RSP\_72,

PHPA\_RSP\_74, PHPA\_RSP\_75, PHPA\_RSP\_76, PHPA\_RSP\_77, PHPA\_RSP\_78 e PHPA\_RSP\_79.

A partir destas sequências, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores sem a região que codifica para o peptídeo sinal, acrescentado do sítio CACC para clonagem pelo sistema *Gateway*<sup>®</sup> (Invitrogen) no iniciador F. Os genes foram amplificados por PCR a partir das sequências clonadas no vetor pYST e em seguida clonados no vetor de entrada pENTR<sup>™</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). Posteriormente, as sequências foram recombinadas no vetor de destino pEDV6 (Figura 7), segundo as instruções do *kit Gateway*<sup>®</sup> LR Clonase<sup>™</sup> II Enzyme Mix (Invitrogen) e confirmadas por sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos específicos de cada clone.

O vetor pEDV6 foi gentilmente cedido pelo Dr. Jonathan D.G. Jones do The Sainsbury Laboratory, Inglaterra.

Para a transformação de *Psg4* com o vetor pEDV6 foram utilizadas células eletrocompetentes obtidas a partir do item 4.2.3. A transformação de *Psg4* com o vetor pEDV6 contendo os respectivos genes citados acima, foi efetuada por eletroporação e os transformantes selecionados em meio seletivo contendo os antibióticos rifampicina (100µg/mL) e gentamicina (25µg/mL).



**Figura 7-** Mapa do vetor pEDV6 utilizado na translocação de proteínas via SST3. Este vetor é compatível com o sistema Gateway.

#### 4.3.2- Avaliação da indução da reação de hipersensibilidade por Psg4 transformada com os genes candidatos clonados no vetor pEDV6

Com a finalidade de verificar se a expressão das proteínas candidatas poderia interferir na funcionalidade do SST3, ou atuarem como supressores de morte celular, efetuou-se a infiltração de folhas de tabaco com as suspensões bacterianas nas OD<sub>600</sub>= 1,0; 0,5; 0,1 e 0,01, sem a adição do surfactante. A infiltração foi feita com o auxílio de seringas ausente de agulha, pressionando o limbo foliar para a infiltração da suspensão bacteriana. Os tratamentos controle

foram: solução salina e a construção pEDV6 vazio, como controle negativo e pVSP61-avrB como controle positivo.

#### **4.3.3- Análise funcional dos genes candidatos a efetores em genótipos de soja resistentes ao isolado PPUFV02, baseada no SST3 de Psg4**

Nesta análise empregou-se suspensão bacteriana na concentração  $OD_{600}=0,01$ , acrescentado do surfactante Silwet L-77 a 0,02%. A inoculação dos genótipos de soja com os transformantes de Psg4 contendo os genes candidatos foram realizadas por infiltração a vácuo, como descrito no item 4.1.3. Após a infiltração, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até o final da avaliação. Os controles negativos consistiram de plantas de todos os genótipos infiltradas com solução de  $MgCl_2$  10mM e com Psg4 + pEDV6 vazio ( $OD_{600}=0,01$ ), e o controle positivo consistiu de Psg4 + pVSP61-avrB ( $OD_{600}=0,01$ ) inoculada nos genótipos Williams e Conquista . A solução salina e as suspensões bacterianas continham Silwet L-77 a 0,02%.

Desta forma, as plantas foram analisadas quanto a evolução temporal dos sintomas, comparativamente ao tratamento Psg4 + vetor pEDV6 vazio, e quanto a ocorrência de sintomas de HR similares aos observados nas cultivares Conquista e Williams, inoculados com Psg4 + pVSP61-avrB.

## 5- Resultados

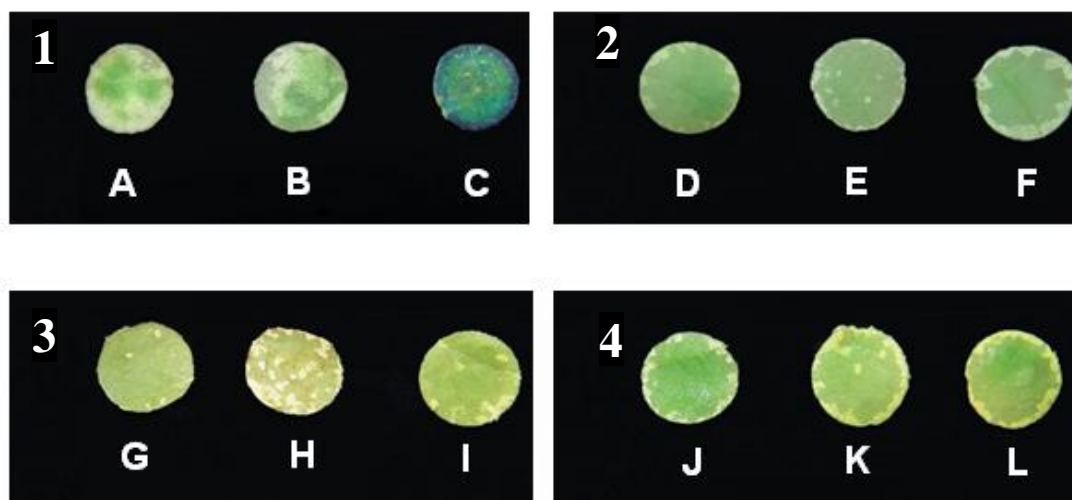
### 5.1- Análise da expressão transiente do gene repórter *GUSPlus* em soja e em tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Nas plantas de tabaco foi observada a expressão do gene *GUSPlus* as 48 e 72 hpi (Figura 8.1C). Nas plantas inoculadas com a solução de infiltração e com a *Agrobacterium* EHA105, representando os controles negativos, não foi observada qualquer expressão do gene *GUSPlus* (Figuras 8.1A e 8.1B).

A agroinfiltração feita em folhas de soja com a mesma concentração de suspensão bacteriana utilizada em folhas de tabaco ( $OD_{600}=0,4$ ), e em outras concentrações testadas (0,1; 0,2; 0,5) não resultou em expressão do gene *GUSPlus* nos discos foliares coletados.

Kapila *et al.* (1997) relataram uma diminuição na eficiência da transformação quando a cultura de *Agrobacterium* foi crescida em pH neutro. Desta forma, foi avaliada o cultivo da bactéria em meio de cultura com pH 5,6, e acrescidos ainda de acetoseringona ( $20\mu\text{M}$ ) tanto no meio de crescimento quanto na solução de infiltração, como foi descrito por Kapila *et al.* (1997), porém, não resultou na alteração do padrão de expressão obtido. A expressão do gene *GUSPlus* foi evidenciada em discos foliares de tabaco tanto em condições de pH 7,0 quanto em pH 5,6. Entretanto, não foi observada a expressão do gene *GUSPlus* em discos foliares provenientes das cultivares de soja infiltradas com suspensão de agrobactérias crescidas nas duas condições de pH.

A cultivar de soja Bragg é relatada como mais suscetível a estirpes de *Agrobacterium* (Droste *et al.*, 1994), e a cultivar CAC-1 possui uma melhor regeneração após transformação (Gesteira, 2002). No entanto, de forma similar ao verificado para a cultivar Conquista, não foi verificada a expressão transiente do gene *GUSPlus* em folhas agroinfiltradas dessas cultivares (Figuras 8.2, 8.3 e 8.4).



**Figura 8.** Visualização da atividade do gene *GUSPlus* por meio do teste histoquímico realizado em discos foliares agroinfiltrados com solução de infiltração, *Agrobacterium* estirpe EHA105 e EHA105 contendo o vetor pCAMBIA 1305.1, as 48 hpi. 1, 2, 3 e 4: discos foliares de tabaco, soja cultivar Conquista, soja cultivar Bragg e soja cultivar CAC-1, respectivamente; A, D, G e J: discos foliares inoculados com solução tampão; B, E, H e L: discos inoculados com a estirpe EHA105; C, F, I e L: discos inoculados com a construção EHA105-pCAMBIA1305.1.

## 5.2- Estabelecimento de um protocolo para a análise funcional de proteínas secretadas em soja, utilizando a traslocação mediada pelo SST3 de Psg4

Uma premissa para análise de expressão transiente dos genes de *P. pachyrhizi* utilizando o SST3 de Psg4 é a suscetibilidade dos genótipos resistentes de soja ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* a esta bactéria. Desta forma, inicialmente foi avaliada a suscetibilidade de 14 genótipos de soja à Psg4, sendo dois suscetíveis e 12 resistentes ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* (Tabela 1). Todos os genótipos de soja testados foram suscetíveis à Psg4 (Figura 9B e 9E) (Tabela 1), não apresentando sintomas de resposta de hipersensibilidade. As plantas inoculadas somente com a solução salina adicionado de Silwet-L77 a 0,02% não apresentaram qualquer sintoma (Figura 9A e 9D), evidenciando que os sintomas visualizados na inoculação com Psg4 eram devido a infiltração com a bactéria. Todavia, a evolução dos sintomas foi muito rápida, culminando com o amarelecimento e necrose das folhas inoculadas. O mesmo resultado foi observado com as plantas inoculadas com a suspensão bacteriana na  $OD_{600} = 0,1$ . Nas plantas inoculadas com a suspensão bacteriana na  $OD_{600} = 0,01$ , observou-se

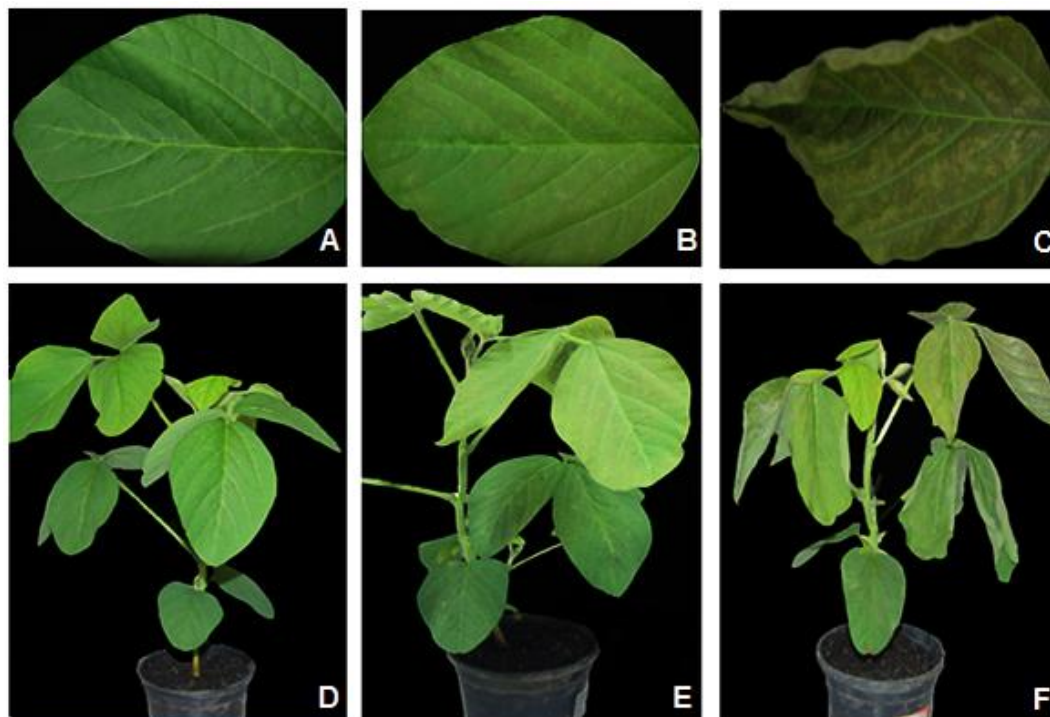
um desenvolvimento gradual dos sintomas, permitindo uma melhor comparação dos genótipos avaliados. Nesta condição de inoculação, o genótipo mais suscetível foi PI 594754, seguido dos genótipos PI 587880-A e PI 594538-A. Não se obteve uma infiltração uniforme das folhas do genótipo Shiranui, mesmo deixando as plantas no vácuo por um período maior de tempo. Todavia, mesmo nessas condições obteve-se reprodução de sintomas de doença, mesmo nas plantas inoculadas com  $OD_{600} = 0,01$ .

Dentre os 14 genótipos de soja avaliados, somente os genótipos Conquista, Williams 82 e PI 459025 apresentaram HR (Figura 9C e 9F) após a infiltração com Psg4 + pVSP61-avrB em todas as concentrações utilizadas (Tabela 1). A HR observada nas plantas inoculadas com a suspensão na  $OD_{600} = 0,01$  foi menos confluyente e observada aos 48 hpi, enquanto nas plantas onde se utilizou a  $OD_{600} = 0,5$ , observou-se forte necrose das folhas inoculadas as 24 hpi. O fenótipo de HR indica a translocação da proteína avrB para células do hospedeiro por meio do SST3 de Psg4, e o seu reconhecimento pela proteína de resistência correspondente ao gene *RPG1*, presente nestes genótipos. A cultivar Williams 82 possui o gene *RPG1* (Zou *et al.*, 2005). Os genótipos Conquista e PI 459025, por apresentarem o mesmo fenótipo de HR da cultivar Williams 82, provavelmente contêm o gene *RPG1*. Este resultado permitiu o uso da construção pVSP61-avrB como controle positivo nas análises funcionais de proteínas candidatas a efetores de *P. pachyrhizi* via SST3 de Psg4, pelo método de infiltração a vácuo.

**Tabela 1 – Reações de genótipos de soja, com reação conhecida à inoculação com o isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*, reação à inoculação com Psg4 e Psg4 contendo a construção pVSP61-avrB.**

<b>Genótipos de soja</b>	<b>Reação à inoculação com o isolado PPUFV02</b>	<b>Reação à inoculação com Psg4</b>	<b>Reação à inoculação com pVSP61-avrB</b>
PI 200487 ( <i>Rpp5</i> )	RB	S	S
PI 230970 ( <i>Rpp2</i> )	RB	S	S
PI 459025 ( <i>Rpp4</i> )	RB	S	HR
PI 471904 ( <i>Rpp5</i> )	RB	S	S
PI 561356	RB	S	S
PI 587880-A	RB*	S	S
PI 587886	RB	S	S
PI 587905	RB*	S	S
PI 594538-A ( <i>Rpp1b</i> )	RB*	S	S
PI 594754	IF	S	S
PI 594767-A	RB*	S	S
Shiranui ( <i>Rpp5</i> )	ND	S	S
Willians 82	TAN	S	HR
Conquista	TAN	S	HR

IF= Imune com flecks, RB= lesão RB, RB\*= lesão RB com flecks, TAN= lesão tipo TAN, ND= lesões não determinadas, conforme Costa (2010). S= Sintomas de “water-soaking” circundada por halos cloróticos que podem coalescer apresentando lesões necróticas, e HR= reação de hipersensibilidade.



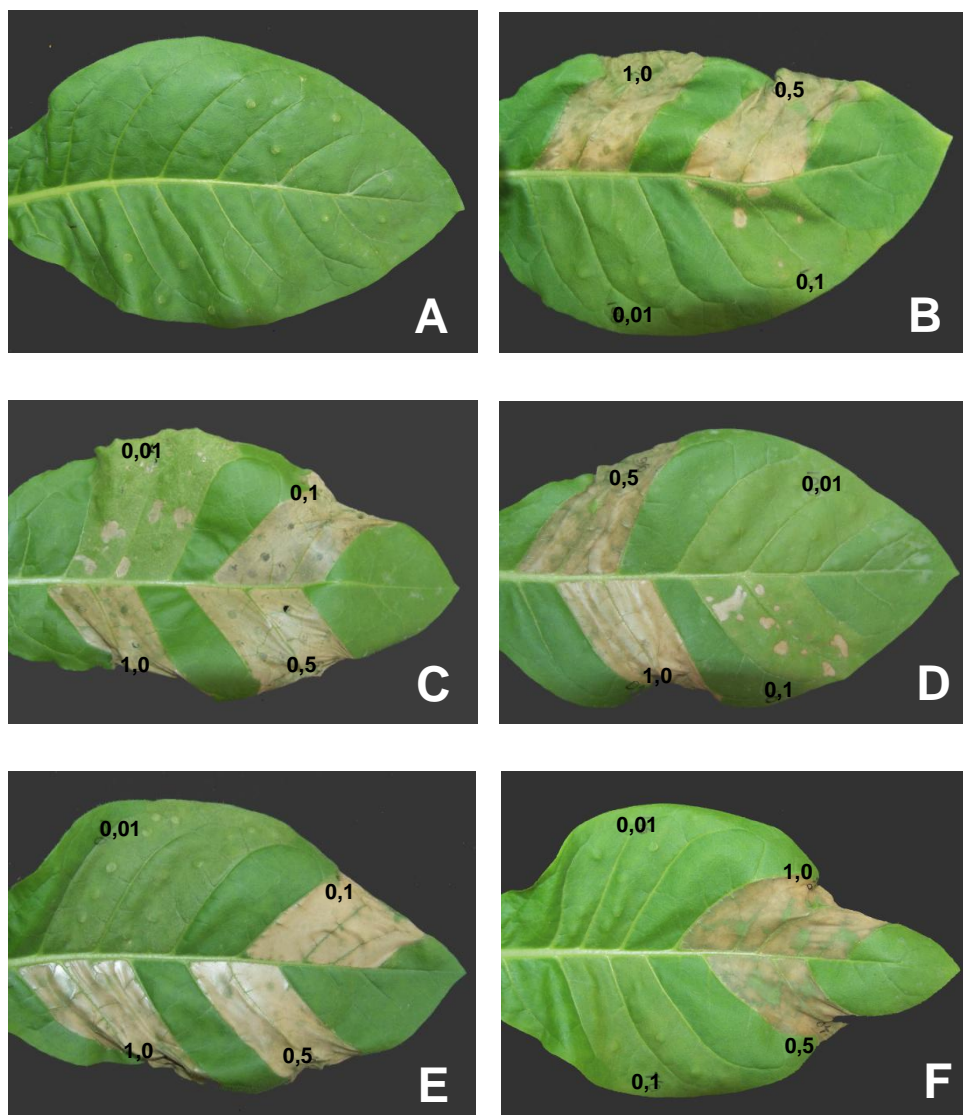
**Figura 9** – Sintomas observados em folíolos de soja, 48h após a infiltração à vácuo com: A e D – solução de  $MgCl_2$  10mM ; B e E –suspensão de células de Psg4 ( $OD_{600}=0,5$ ) em  $MgCl_2$  10mM; C e F – suspensão de células da construção pVSP61-avrB ( $OD_{600}=0,5$ ) em  $MgCl_2$  10mM.

### 5.3- Clonagem dos genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* no vetor pEDV6 e análise de expressão transiente mediado pelo SST3 de Psg4

Para a análise das proteínas candidatas a efetores foram clonados, no total, 12 genes candidatos no vetor de entrada pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> que foram posteriormente transferidos para o vetor pEDV6. A clonagem de 10 genes foi confirmada por sequenciamento, sendo que nove construções (pEDV-PHPA\_RSP\_12, pEDV-PHPA\_RSP\_65, pEDV-PHPA\_RSP\_67, pEDV-PHPA\_RSP\_71, pEDV-PHPA\_RSP\_72, pEDV-PHPA\_RSP\_74, pEDV-PHPA\_RSP\_75, pEDV-PHPA\_RSP\_77 e pEDV-PHPA\_RSP\_78) transformadas em Psg4 foram utilizadas nos estudos funcionais neste trabalho.

Dentre os clones avaliados quanto a capacidade de indução de HR em tabaco (Tabela 2), dois (Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_71 e Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_78) mostraram uma menor capacidade de indução de HR (Figura 10F) e somente um (Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_77) causou HR macroscópica na

OD<sub>600</sub>=0,1 (Figura 10E), resultado semelhante obtida pela infiltração de Psg4 + pVSP61-avrB (Figura 10C). Os demais transformantes apresentaram capacidade de indução de HR igual a Psg4 + pEDV6 vazio (Figuras 10B e 10D), sendo a HR observada nas seções foliares infiltradas com as OD<sub>600</sub>= 0,5 e 1,0. Não se observou qualquer sintoma nas folhas infiltradas somente com a solução MgCl<sub>2</sub> a 10mM (Figura 10A).



**Figura 10-** Sintomas de HR observados em folhas de tabaco 48 horas após a infiltração com diluições seriadas de diferentes construções: A- solução salina; B- pEDV6 vazio; C- pVSP61-avrB; D- pEDV6-PHPA\_RSP\_12; E- pEDV6-PHPA\_RSP\_77; F- pEDV6-PHPA\_RSP\_78.

**Tabela 2. Ocorrência de reação de hipersensibilidade (HR) nas folhas de tabaco infiltradas com diferentes concentrações de células de Psg4 contendo as construções com os genes candidatos a efetores do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*.**

Candidatos a efetores e controles	OD <sub>600</sub>			
	1,0	0,5	0,1	0,01
PHPA_RSP_12	HR	HR	nnc	am
PHPA_RSP_65	HR	HR	nnc	am
PHPA_RSP_67	HR	HR	nnc	-
PHPA_RSP_71	HR*	HR*	am	-
PHPA_RSP_72	HR	HR	nnc	am
PHPA_RSP_74	HR	HR	nnc	am
PHPA_RSP_75	HR	HR	nnc	am
PHPA_RSP_77	HR	HR	HR	am
PHPA_RSP_78	HR*	HR*	am	-
pEDV6 vazio	HR	HR	nnc	am
avrB	HR	HR	HR	nnc
Solução salina	-	-	-	-

HR= hipersensibilidade; HR\*= hipersensibilidade atenuada; nnc= necrose não confluyente; am= fraco amarelecimento; - = nenhum sintoma evidente.

De modo geral, os sintomas observados nas plantas de soja inoculadas com Psg4 contendo os diferentes genes candidatados foram observados aos 48 hpi. Aos 8 dpi, as folhas inoculadas encontravam-se, em sua maioria, amareladas e, ou, necrosadas. O fenótipo de HR foi observado somente nas cultivares Williams 82 e Conquista inoculadas com Psg4 + pVSP61-avrB, a partir de 48 hpi.

Os sintomas observados nos diferentes genótipos em resposta a inoculação com os genes candidatos foi variável, sendo observados redução, aumento ou ausência de alteração significativa na evolução dos sintomas, comparativamente às plantas dos mesmos genótipos inoculados com Psg4 + pEDV6 vazio, dependendo da combinação gene candidato-genótipo (Tabela 3).

**Tabela 3-** Análise comparativa da severidade dos sintomas observados em diferentes genótipos de soja em resposta à inoculação com Psg4 contendo diferentes genes candidatos (PHPA\_RSP) clonados no vetor pEDV6, tendo como referência os sintomas obtidos na inoculação dos mesmos genótipos com Psg4 contendo o vetor pEDV6 vazio.

Genótipos de soja	Genes candidatos								
	PHPA_RSP_12	PHPA_RSP_65	PHPA_RSP_67	PHPA_RSP_71	PHPA_RSP_72	PHPA_RSP_74	PHPA_RSP_75	PHPA_RSP_77	PHPA_RSP_78
PI 200487 (Rpp5)	ns	ns	+	-	ns	ns	-	-	ns
PI 230970 (Rpp2)	ns	ns	+	ns	+	+	+	ns	ns
PI 459025 (Rpp4)	+	+	+	+	ns	+	ns	ns	++
PI 471904 (Rpp5)	ns	+	+	ns	ns	ns	-	ns	+
PI 561356	ns	+	ns	na	ns	ns	ns	na	ns
PI 587880-A	ns	-	ns	-	-	ns	ns	-	-
PI 587886	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns	ns
PI 587905	ns	ns	ns	ns	-	ns	-	ns	ns
PI 594538-A (Rpp 1b)	ns	+	ns	-	+	ns	ns	na	+
PI 594754	+	-	ns	-	ns	ns	ns	na	-
PI 594767-A	--	-	+	-	ns	ns	+	-	-
Shiranui	ns	+	+	ns	-	-	+	ns	ns
Willians 82	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Conquista	-	ns	ns	ns	ns	-	ns	ns	+

OD<sub>600</sub>=0,01; ns: não houve diferença significativa nos sintomas comparativamente aqueles observados nas plantas do mesmo genótipo inoculadas com Psg4 contendo o vetor pEDV6 vazio; + e ++: intensidades de aumento da severidade da doença; - e --: intensidades de diminuição da severidade da doença; na: não avaliado. Os resultados contêm a média das três repetições avaliadas. Dados coletados aos 6 dpi.

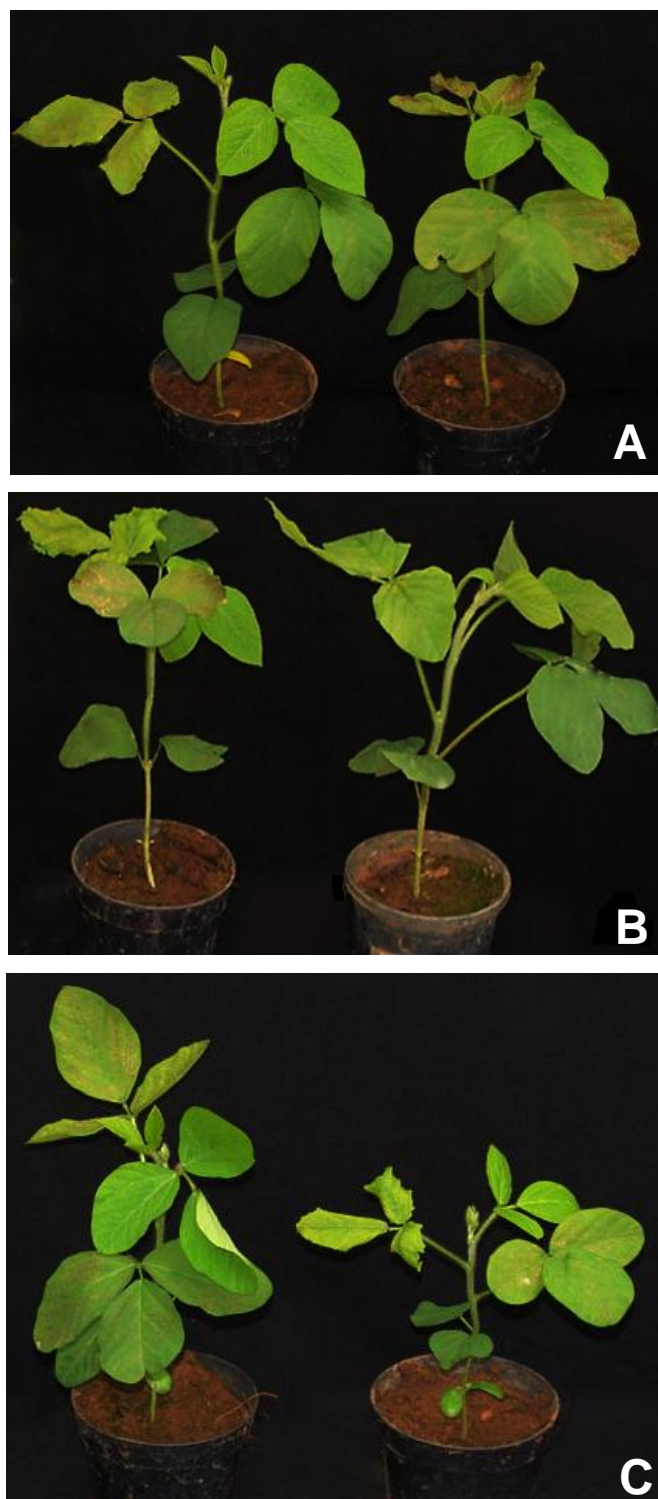
O clone pEDV6-PHPA\_RSP\_67 foi o único clone que causou somente aumento na severidade da doença em alguns genótipos ou ausência de alteração significativa na evolução da doença em relação à inoculação com Psg4 + pEDV6-vazio. Por outro lado, foi observada uma evolução mais lenta da doença em todos os genótipos inoculados com Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_71 (Figura 11). Mesmo nessas condições, foi possível detectar redução, aumento ou ausência de alteração significativa na evolução dos sintomas, dependendo do genótipo avaliado, aos 6 dpi. Este resultado foi confirmado em um segundo experimento independente.



**Figura 11-** Severidade dos sintomas observados no primeiro trifólio de plantas do genótipo PI 594754, inoculadas com Psg4 + pEDV6 vazio (à esquerda) e Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_71 (à direita), numa concentração de  $OD_{600} = 0,01$  aos 5 dpi. Notar o forte amarelecimento dos folíolos do trifólio na planta inoculada com Psg4 + pEDV6 vazio e um leve amarelecimento do trifólio naquela inoculada com Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_71.

Merece destaque também o clone Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_78 que induziu necrose nos folíolos do genótipo PI 587880-A já aos 24 hpi, e menor severidade da doença aos 6 dpi (Figura 12A). Estes sintomas de necrose precoce também foram verificados nos genótipos PI 459025 e PI 594538-A, que, entretanto, na avaliação efetuada aos 6dpi, mostraram uma maior severidade da

doença comparativamente à inoculação com Psg4 + pEDV6 vazio (Figura 12B e 12C).



**Figura 12** – Sintomas observados em genótipos de soja inoculados com Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_78 (esquerda de cada quadro) e Psg4 + pEDV6 vazio (a direita de cada quadro). A- genótipo PI 587880-A; B- genótipo PI 459025; C- genótipo PI 594538-A. Fotos tiradas aos 6 dpi.

## 6- Discussão

Os efetores fúngicos normalmente são representados por proteínas secretadas que podem suprimir as respostas de defesa, aumentando a severidade da doença, ou desencadear uma resposta de defesa por meio do seu reconhecimento pelo sistema imune vegetal. Zaramela (2011) identificou vários genes do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas e Costa (2010) verificou que vários genótipos de soja apresentam resistência a este mesmo isolado. Assim, de acordo com a teoria gene a gene de Flor (1942) é possível que algum dos genes identificados por Zaramela (2011) sejam genes de avirulência, ou seja, genes que codificam proteínas efetoras reconhecidas por proteínas codificadas por genes *R*. A maioria das proteínas *R* clonadas são proteínas citoplasmáticas com domínio NBS-LRR, incluindo a proteína Rpp4, que confere resistência à *P. pachyrhizi* (Meyer *et al.*, 2009). Desta forma, a expressão transiente ou translocação das proteínas efetoras do isolado PPUFV02 para o citoplasma dos genótipos resistentes pode ser utilizada como ferramenta para identificar proteínas efetoras capazes de desencadear respostas de defesa, dentre elas a reação de hipersensibilidade. Com esta perspectiva em mente, avaliou-se a possibilidade do uso da expressão transiente mediada por *A. tumefaciens* e da translocação de proteínas efetoras mediadas pelo SST3 do patógeno *P. syringae* como ferramentas na identificação de proteínas efetoras do isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi*.

Não se observou a expressão do gene *GUSPlus* em folhas de três diferentes genótipos de soja agroinfiltradas com *A. tumefaciens* EHA105 contendo o vetor pCAMBIA 1305.1. Nas mesmas condições de preparo de inóculo, concentração de células bacterianas e inoculação, observou-se a expressão consistente do gene *GUSPlus* em tabaco, sugerindo que a soja, em particular o tecido foliar, seja resistente à infecção por *A. tumefaciens*, impedindo a transferência do T-DNA para as células do tecido foliar em contato com a agrobactéria. Isso pode ocorrer se proteínas receptoras da soja (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) reconhecer padrões moleculares de *A. tumefaciens* (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), ativando a resposta de defesa

PTI, e esse patógeno não possui efetores capazes de suprimi-la. Essa hipótese é corroborada pelos resultados recentes obtidos em *Arabidopsis*, onde a expressão transiente mediada por *Agrobacterium* é também pouco eficiente e genótipo-dependente. Tsuda *et al.*, (2011) conseguiram expressão transiente robusta e consistente em plantas de *Arabidopsis* que expressam a proteína AvrPto, que é capaz de suprimir respostas de defesa mediada por vários PRRs. A adoção de uma abordagem similar em soja, com o objetivo de utilizar a expressão transiente mediada por *Agrobacterium* para identificar efetores de fitopatógenos, é pouco prática pelo fato de necessitar de uma transformação dos diferentes genótipos, contendo os diferentes genes *R*, com um supressor de respostas de defesa, como, por exemplo, *AvrPto*.

A suscetibilidade dos genótipos de soja resistentes ao isolado PPUFV02 de *P. pachyrhizi* à raça 4 de *P. syringae* pv. *glycinea* tornou mais exequível a utilização do sistema EDV, baseado no SST3, na avaliação funcional de grande número de candidatos a efetores, como praticado no presente trabalho.

Na identificação de efetores reconhecidos por proteínas R e, portanto, capazes de induzir a reação de hipersensibilidade, são utilizadas agroinfiltração ou inoculação com elevadas concentrações bacterianas ( $>10^8$  células/ml), visando obter uma resposta de hipersensibilidade rápida e visível macroscopicamente. Todavia, o uso dessa concentração limita a descoberta de efetores com papel exclusivo na agressividade. Desta forma, a observação da ocorrência de HR na cultivar Williams 82 inoculada com Psg4 + pVSP61-avrB na  $OD_{600} = 0,01$ , e o desenvolvimento mais lento dos sintomas em plantas suscetíveis levou a seleção dessa concentração para uma primeira triagem funcional dos nove genes candidatos analisados. Dessa triagem despontaram como promissores para uma análise funcional mais refinada os efetores PHPA\_RSP\_71 e PHPA\_RSP\_78.

A expressão de PHPA\_RSP\_71 em Psg4, resultou na supressão parcial da indução de HR não-específica em tabaco, que é uma planta não-hospedeira, e uma menor evolução dos sintomas em todos os genótipos de soja analisados. Esses resultados poderiam ser explicados pelo bloqueio parcial da secreção dos efetores bacterianos via SST3, em decorrência da expressão da proteína PHPA\_RSP\_71 em Psg4. A análise comparativa da secreção *in vitro* dos efetores de Psg4

transformada com pEDV6- PHPA\_RSP\_71 e pEDV6-vazio permitiria suportar ou não essa hipótese. Uma explicação alternativa seria um papel desse efector na supressão da morte celular em tabaco e em soja. Nesta planta hospedeira, isto contribuiria para o retardamento do desenvolvimento dos sintomas associados com a patogênese de Psg4. No caso de *P. pachyrhizi*, um efector dessa natureza contribuiria para a supressão das respostas de defesa, favorecendo o desenvolvimento da fase biotrófica da patogênese. A validade dessas hipóteses poderia ser comprovada por meio da inoculação conjunta de Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_71 e Psg4 + pVSP61-avrB e a inoculação com Psg4 co-transformada de pEDV6-PHPA\_RSP\_71 e pVSP61-avrB. É de se esperar uma atenuação exclusiva da HR na inoculação com Psg4 co-transformada com pDEV6-PHPA\_RSP\_71 e pVSP61-avrB, se o efector PHPA\_RSP\_71 bloqueia parcialmente o SST3. Caso PHPA\_RSP\_71 atue como um supressor da HR não-específica e da HR decorrente do reconhecimento do gene *avrB*, uma atenuação dos sintomas de HR, tanto nas inoculações conjunta, quanto na inoculação de Psg4 co-transformada com os genes que codificam os dois efetores, será observada. Vale ressaltar que efetores com esse papel duplo foram descritos em *Phytophthora infestans* (Kelley *et al.*, 2010) e em fitobactérias (Fujikawa *et al.*, 2006).

De modo similar a PHPA\_RSP\_71, PHPA\_RSP\_78 também suprimiu parcialmente a indução de HR não-específica em tabaco. Porém, em soja, causou um aumento da severidade dos sintomas da doença em alguns genótipos, como por exemplo PI 459025, e redução da severidade em outros, como no PI 587880-A. Esse genótipo apresentou sintomas de necrose aos 24 hpi com Psg4 + pEDV6-PHPA\_RSP\_78, e uma redução na severidade da doença em relação a inoculação com Psg4 + pEDV6 vazio aos 6 dpi. Assim, é possível que a necrose observada as 24 hpi, seja uma reação de hipersensibilidade decorrente do reconhecimento desse efector pela proteína codificada pelo gene de resistência *Rpp1*, presente no genótipo PI 587880-A (Ray *et al.*, 2009). Por outro lado, a maior severidade em PI 459025 possa ser devido a uma atividade supressora de respostas de defesa por esse efector. Curiosamente, PHPA\_RSP\_78, é o único candidato a efector caracterizado por Zaramela (2011) que codifica uma proteína de 137aa com um

motivo Y/F/WxC comum entre proteínas candidatas a efetores do fungo biotrófico *Blumeria graminis*. Além disso, com base na análise de ESTs efetuada por Zaramela (2011), esse gene é expresso somente durante a interação de *P. pachyrhizi* com a soja.

Todos os candidatos a efetores analisados, exceto o PHPA\_RSP\_67, causaram redução, aumento ou ausência de alteração significativa na evolução dos sintomas, de maneira genótipo-dependente. Resultados similares foram obtidos por Fabro *et al.* (2011) na análise funcional de candidatos a efetores de *Hyaloperonospora arabidopsidis* em diferentes genótipos de *Arabidopsis* utilizando o sistema EDV. O fato da maioria dos efetores avaliados ter contribuído para uma maior agressividade de *H. arabidopsidis* em um ou mais genótipos, levou esses autores a proporem que a agressividade deste patógeno em diferentes genótipos é o resultado da atuação de vários efetores que apresentam efeitos genótipos específicos fracos, sendo alguns alvos dos efetores conservados entre diferentes genótipos, e outros variáveis. Assim, a diferença observada entre os genótipos de soja testados, quanto ao aumento, redução ou nenhuma variação significativa da doença em resposta a um determinado efector, pode ser devido à variabilidade do background genético dos diferentes genótipos de soja avaliados.

Considerando a concentração de células de Psg4 utilizada na inoculação dos diferentes efetores, é possível que a redução de sintomas observada em alguns genótipos seja resultado do possível reconhecimento dos efetores por proteínas R. Assim, é interessante a dinâmica do crescimento populacional de Psg4 contendo, ou não, genes efetores nesses genótipos. Também é interessante avaliar esse possível reconhecimento por meio da translocação dos efetores potencialmente reconhecidos utilizando a estirpe EtHAN da bactéria de solo *P. fluorescens* Pf0-1 que contém um SST3, utilizando concentrações elevadas de células bacterianas, seguido da observação macroscópica de HR, aos 24hpi. EtHAN não é patogênica a soja, de forma que quando inoculada, não desenvolve sintomas na planta, ao contrário de Psg4 (Thomas *et al.*, 2009). Isso permitiria discernir a necrose decorrente da HR, da morte celular decorrente da atuação dos efetores no processo de patogênese de Psg4.

## 7- Conclusões

A resistência do tecido foliar de soja à infecção por *A. tumefaciens* impediu o uso da agroinfiltração no estudo funcional de genes efetores de *P. pachyrhizi*. Por outro lado, o protocolo de análise de expressão transiente de proteínas efetoras através do SST3 de Psg4 foi estabelecido, possibilitando a análise funcional de candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* com base no sistema EDV. No total, doze genes candidatos a efetores foram clonados no vetor pEDV6, dentre estes, nove foram submetidos à análise funcional mediada pelo SST3 de Psg4. Isto permitiu a seleção de combinações de potenciais efetores-genótipos de soja evidenciando os efetores PHPA\_RSP\_71 e PHPA\_RSP\_78 para estudos funcionais mais detalhados.

As clonagens de outros candidatos e a análise de expressão transiente desses possíveis efetores encontram-se em andamento. Em ensaios futuros, os fenótipos das plantas infiltradas serão comparados com análises de curva de crescimento da bactéria, para visualizar se há correspondência entre o desenvolvimento da doença e o aumento de células bacterianas. Além disso, transformações utilizando a estirpe EtHAN de *P. fluorescens* Pf0-1 com os clones contendo os genes efetores serão realizados, com o propósito de obter uma melhor visualização do possível desencadeamento de HR após sua infiltração em plantas de soja.

A análise funcional dessas proteínas efetoras contribui para o melhor esclarecimento da interação no patossistema soja-*P. pachyrhizi*, auxiliando ainda no desenvolvimento de novas cultivares resistentes à FAS que sejam mais duráveis no campo, estabelecendo uma grande economia dos atuais gastos com a doença.

## 8- Referências bibliográficas

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

Abramovitch, R. and Martin G. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, v.7, p.356-364, 2004.

Ashfield, T.; Danzer, J.R.; Held, D.; Clayton, K.; Keim, P.; Saghai Maroof, M.A.; Webb, D.M.; Innes, R.W. *Rpg1*, a soybean gene effective against races of bacterial blight, maps to a cluster of previously identified disease resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, v.96, p.1013-1021, 1998.

Ashfield, T.; Keen, N.T.; Buzzell, R.I.; Innes, R.W. Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the *RPG1* locus. *Genetics*, v.141, p.1597-1604, 1995.

Bittel, P. & Robatzek, S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v.10, p.335-341, 2007.

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

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

Bromfield, K.R. Soybean Rust. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 1984. 65p (American Phytopathological Society. Monograph, 11).

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

Brown, J.K.; Hovmoller, M.S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, v.297, p.537-541, 2002.

Büttner, D. & He, S.Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, v.150, p.1656-1664, 2009.

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

CAMBIA. Disponível em:  
[http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html#dsy585\\_Description](http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html#dsy585_Description). Acesso em janeiro de 2012.

Cambronne, E.D. & Roy, C.R. Recognition and Delivery of Effector Proteins into Eukaryotic Cells by Bacterial Secretion Systems. *Traffic*, v.7, p.929-939, 2006.

Carneiro, L.C. Caracterização epidemiológica da resistência parcial e análise da tolerância de genótipos de soja à ferrugem asiática. Piracicaba, SP, 76p. Tese de

Doutorado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz na universidade de São Paulo, 2007.

Catanzariti, A.M., Dodds, P.N, Lawrence, G..J., Ayliffe, M.A. & Ellis, J.G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiology Letters, Minireview*, v.269, p.181-188, 2007.

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

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

Chen, X.; Equi, R.; Baxter, H.; Berk, K.; Han, J.; Argawai, S.; Zale, J. A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings. *Biotechnology for biofuels*, v.3 ,n.9, p.1-10, 2010.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em janeiro de 2012.

Consórcio Antiferrugem. Disponível em: <http://www.consorcioantiferrugem.net>. Acesso em dezembro de 2011.

Costa, P.M. Caracterização e expressão transiente de genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas. Viçosa, MG, 83p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

Dang, W. & Wei, Z. An optimized-*Agrobacterium* mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science*, v.173, p.381-389, 2007.

Dangl, J.L & Jones, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, v.411, p.826-833, 2001.

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

De Wit, P.J.G.M.; Mehrabi, R.; Van Den Burg, H.A.; Stergiopoulos, I. Fungal effector proteins: past, present and future. Review. *Molecular plant pathology*, v.10, n. 6, p.735-747, 2009.

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

Dodds, P.N. & Rathjen, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, v.11, p.539-548, 2010.

Droste, A.; Bodanese-Zanettini, M.H.; Mundstock, E.; Hu, C. Susceptibility of Brazilian soybean cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Brazilian Journal of Genetics*, v.17, n.1, p.83-88, 1994.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em janeiro de 2012.

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

Fabro, G.; Steinbrenner, J.; Coates, M.; Ishaque, N.; Baxter, L.; Studholme, D.J.; Korner, E.; Allen, R.L.; Piquerez, S.J.M.; Rougon-Cardoso, A.; Greenshields, D.; Lei, R.; Badel, J.L.; Caillaud, M.; Sohn, K.; Van den Ackerveken, G.; Parker, J.E.; Beynon, J.; Jones, J.D.G. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. *Plos Pathogens*, 7(11):e1002348 (2011), doi:10.1371/journal.ppat.1002348.

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

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

Freire, M.C.M.; Oliveira, L.O.; Almeida, A.M.R.; Schuster, I.; Moreira, M.A.; Liebenberg, M.M.; Mienie, C.M.S. Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetics and Molecular Biology*, v.31, p.920-931, 2008.

Fugikawa, T.; Yamashita, T.; Tsuyumu, S. Hypersensitive response suppression by type III effectors of plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, v.72, n.3, p.176-179, 2006.

Fundação Mato Grosso. Disponível em: <http://www.fundacaomt.com.br/soja>. Acesso em janeiro de 2012.

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

Gesteira, A. da S. Avaliação do potencial embriogênico de cultivares de soja e transformação com o gene citrato sintase. Viçosa, MG, 65p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, 2002.

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

Greenberg, J.T. & Vinatzer, B.A. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology*, v.6, p.20-28, 2003.

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

Guerche, P.; Bellini, C.; Le Moullec, J.M.; Caboche, M. Use of a transient expression assay for the optimization of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. *Biochimie*, v.69, p.621–628, 1987.

Hartman, G.L.; Miles, M.R.; Frederick, R.D. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, v.89, p.664–666, 2005.

Hartwig, E.E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science*, v.26, p.1135–1136, 1986.

Hartwig, E.E.; Bromfield, K.R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. *Crop Science*, v.23, p.237–239, 1983.

Hidayat, O.O.; Sommatmadja, S. Screening of soybean breeding lines for resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow). *Soybean Rust News*, v.1, p.9–22, 1977.

Hood, E.E.; Gelvin, S.B.; Melchers, L.S.; Hoekema, A. New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, v.2, p.208–218, 1993.

Hyten, D.L.; Hartman, G.L.; Nelson, R.L.; Frederick, R.D.; Concibido, V.C.; Narvel, J.M.; Cregan, P.B. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. *Crop Science*, v.47, p.837–838, 2007.

Index Fungorum. Disponível em:  
<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>. Acesso em fevereiro de 2012.

Janssen, B.J. & Gardner, R. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*, v.14, p.61–72, 1990.

Jeong, R.; Hwang, S.; Kang, S., Choi, H.; Park, J., Kim, K. Virus-induced gene silencing as tool for functional genomics in a *Glycine max*. *The Plant Pathology Journal*, v.21, p.158–163, 2005.

Jones, J. D. & Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, v.444, p.323–329, 2006.

Kamoun, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, v.44, p.41–60, 2006.

Kamoun, S. The secretome of plant-associated fungi and oomycetes. In: Deising, H. & Essey, K. *The Mycota*, p.173–180, 2009.

Kapila, J.; DeRycke, R.; VanMontagu, M.; Angenon, G. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, v.122, p.101–108, 1997.

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

- Koch, E.; Ebrahimnesbat, F.; Hoppe, H.H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. *Phytopathology*, v.106, p.302–320, 1983.
- Kubori, T.; Sukhan, A.; Aizawa, S.I.; Galan, J.E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, v.97, p.10225–10230, 2000.
- Lee, M.W. & Yang, Y. Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. *Methods in Molecular Biology*, v.323, p.225-229, 2006.
- Li, J.F.; Park, E.; von Arnim, A.G.; Nebenfuhr, A. The fast technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods* (2009), doi: 10.1186/1746-4811-5-6.
- Liu, S.; Wei, Z.; Huang, J. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties. *Plant Cell Reports*, v.27, p.489-498, 2008.
- Luderer, R.; de Kock, M.J.D.; Dees, R.H.L.; de Wit, P.J.M.; Joosten, M.H. Functional analysis of cysteine residues of ECP elicitor proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant Pathology*, v.2, p.91–95, 2002.
- Manavella, P.A. & Chan, R.L. Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. *Nature protocols*, v.4, n.11, p.1699-1707, 2009.
- Marchetti, M.A.; Melching, J.S.; Bromfield, K.R. The effects of temperature and dew period on germination and infection by uredospores of *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, St. Paul, v.66, n.4, p.461-463, 1976.
- Marlovits, T.C.; Kubori, T.; Sukhan, A.; Thomas, D.R.; Galan, J.E.; Unger, V.M. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, v.306, p.1040–1042, 2004.
- McLean, R.J.; Byth, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.31, p.951–956, 1980.
- Melching, J.S.; Dowler, W.M.; Koogler, D.L.; Royer, M.H. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. *Plant Disease*, St. Paul, v.73, n.2, p.117-122, 1989.
- Mestre, P.; Brigneti, G.; Baulcombe, D.C. An Ry-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from potato virus Y. *The Plant Journal*, v.23, p.653–661, 2000.
- Meyer, J.D.F.; Silva, D.C.G.; Yang, C.; Pedley, K.F.P.; Zhang, C.; Van de Mortel, M.; Hill, J.H.; Shoemaker, R.C.; Abdelnoor, R.V.; Whitham, S.A.; Graham, M.A. Identification and analyses of candidate genes for *Rpp4*-mediated resistance to asian soybean rust in soybean. *Plant Physiology*, v.150, p. 295–307, 2009.

- Miles, M.R.; Bonde, M.R.; Nester, S.E.; Berner, D.K.; Frederick, R.D.; Hartman, G.L. Characterization resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Plant Disease*, v.95, p.577-581, 2011.
- Miles, M.R.; Levy, C.; Morel, W.; Mueller, T.; Steinlage, T.; Rij, N.; Frederick, R.D.; Hartman, G.L. Internacional fungicide efficacy trials for the management of soybean rust. *Plant Disease*, v.91, p.1450-1458, 2007.
- Morceli, T.G.S; Trevisoli, S.H.U.; Morceli, J.A.A.; Kiihl, R.A.S; Di Mauro, A.O.; Garcia, A. Identification and validation of microsatellite markers linked to the *Rpp5* gene conferring resistance to Asian soybean rust. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, p.1533–1541, 2008.
- Nogueira, S.R. Resistência de plantas hospedeiras e identificação de genes diferencialmente expressos na interação soja - *Phakopsora pachyrhizi*. Viçosa, MG, 98p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- Oliva, R.; Win, J.; Raffaele, S.; Boutemy, L.; Bozkurt, T.O.; Chaparro-Garcia, A.; Segretin, M.E.; Stam, R.; Schornack, S.; Cano, L.M.; van Damme, M.; Huitema, E.; Thines, M.; Banfield, M.J.; Kamoun, S. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology*, v.12, n.6, p.705-715, 2010.
- Panstruga, R.; Dodds, P. N. Terrific proteins traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science*, v. 324, p. 748-750, 2009.
- Pham, T.A.; Miles, M.R.; Frederick, R.D.; Hill, C.B.; Hartman, G.L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease*, v.93, p.224–228, 2009.
- Raveendar, S. & Ignacimuthu, S. Improved *Agrobacterium* mediated transformation in Cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. *Asian Journal of Plant Sciences*, v.9, n.5, p.256-263, 2010.
- Rentel, M.C.; Leonelli, L.; Dahlbeck, D.; Zhao, B.; Staskawicz, B.J. Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, v.105, no. 3, p.1091–1096, 2008.
- Ridout, C. J.; Skamnioti, P.; Porritt, O.; Sacristan, S.; Jones, J. D.; Brown, J. K. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *Plant Cell*, v.18, p.2402-2414, 2006.
- Rooney, H.C.E.; van't Klooster, J.; van der Hoorn, R.A.L.; Joosten, M.H.A.J.; Jones, J.D.G.; de Wit, P.J.D.M. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, v.308, p.1783-1786, 2005.
- Saksirirat, W., Hoppe, H.H. Teliospore Germination of Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *Journal Phytopathology*, v. 132, p. 339 – 342, 1991b.
- Sanford, J.; Smith, F.D.; Russel, J. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, v.217, p.483-509, 1993.

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

Scofield, S.R.; Tobias, C.M.; Rathjen, J.P.; Chang, J.H.; Lavelle, D.T.; Michelmore, R.W.; Staskawicz, B.J. Molecular basis of gene for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, v.274, p.2063–2065, 1996.

Sediyama, T., Teixeira, R.C., Hélio, B. B. Origem, evolução e importância econômica. In: Sediyama, Tuneo. *Tecnologias de produção e usos da soja*. Londrina: Mecenas. p. 1-5, 2009.

Shan, W.X., Cao, M., Dan, L.U.; Tyler, B.M. The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Mol. Plant–Microbe Interactions*, v.17, p.394–403, 2004.

Silva, D.; Yamanaka, N.; Brogin, R.; Arias, C.; Nepomuceno, A.; Di Mauro, A.; Pereira, S.; Nogueira, L.; Passianotto, A.L.; Abdelnoor, R. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, v.117, p.57–63, 2008.

Soares, R.M.; Akamatsuo, H.; Yamanaka, N.; Suenaga, K.; Yamaoka, Y. Ivancovich, A.; Morel, W.; Janegitz, T. Variabilidade patogênica do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Parte I - Projeto Ferrugem da Soja JIRCAS/Embrapa Soja/CRIA/INTA/Tsukuba University. In: **Resumos da Reunião do Consórcio Antiferrugem Safra 2008-09**. Londrina: Embrapa Soja, n.315, p.93-101, 2009a.

Sohn, K.H.; Lei, R.; Nemri, A.; Jones, J.D.G. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, v.19, p.4077–4090, 2007.

Staskawicz, B. J.; Dahlbeck, D.; Keen, N.; Napoli, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 for *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Bacteriology*, v.169, p.5789-5794, 1987.

Staskawicz, B. J.; Dahlbeck, D.; Keen, N. T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* determines race-specific incompatibility on glycine max (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.81, p.6024-6028, 1984.

Stergiopoulos, I. & De Wit, P. Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, v.47, p.233-63, 2009.

Szerek, B.; Rossier, O.; Hause, G.; Bonas, U. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology*, v.46, n.1, p.13-23, 2002.

Tang, X.; Frederick, R.D.; Zhou, J.; Halterman, D.A.; Jia, Y.; Martin, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. *Science*, v.274, p.2060-2063, 1996.

Thomas, W.J.; Thireault, C.A.; Kimbrel, J.A.; Chang, J.H. Recombineering and stable integration of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrc* cluster into the genome

- of the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *The Plant Journal*, v.60, p.919-928, 2009.
- Torto, T. A.; Li, S. A.; Styer, A.; Huitema, E.; Testa, A.; Gow, N. A. R.; van West, P.; Kamoun, S. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research*, v.13, p.1675-1685, 2003.
- Tremblay, A.; Li, S.; Scheffler, B.E.; Matthews, B.F. Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2009), doi: 10.1016/j.pmpp.2009.06.001.
- Tsuda, K.; Qi, Y.; Nguyen, L.V.; Bethke, G.; Tsuda, Y.; Glazebrook, J.; Katagiri, F. An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of Arabidopsis. *The Plant Journal* (2011), doi:10.1111/j.1365-313.2011.04819.x.
- Van der Biezen, E.A. & Jones, J.D.G. Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochemical Science*, v.23, p.454-456, 1998.
- Vakili, N.G. & Bromfield, K.R. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes in Puerto-Rico. *Plant Disease*, v.60, p.995-999, 1976.
- Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'Connor-Sanchez, A.; Willmitzer, L.; Rocha-Sosa, M. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics*, v.220, p.245-250, 1990.
- Van der Hoorn, R.A.L.; Laurent, F.; Roth, R.; De Wit, P.J.G.M. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.13, n.4, p.439-446, 2000.
- van den Hooven, H. W.; Appelman, A. W. J.; Zey, T.; de Wit, P. J. G. M.; Vervoort, J. Folding and conformational analysis of AVR9 peptide elicitors of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Biochemistry*, v.264, p.9-18, 1999.
- van Kan, J. A. L.; Van Den Ackerveken, G. F. J. M.; De Wit, P. J. G. M. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.4, p.52-59, 1991.
- Vleeshouwers, V.G.A.A.; Driesprong, J.D.; Kamphuis, L.G.; Torto-Alalibo, T.; Van't Slot, K.A.E.; Govers, F.; Visser R.G.F.; Jacobsen, E.; Kamoun, S. *Agroinfection*-based high throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. *Molecular Plant Pathology*, v.7, p.499-510, 2006.
- Voegelé, R. T. & Mendgen, R. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, v.159, p.93-100, 2003.
- Yin, C. & Hulbert, S. Prospects for functional analysis of effectors from cereal rust fungi. *Euphytica* (2010), doi: 10.1007/s10681-010-0285-x.

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

Young, N.D. The genetic architecture of resistance. *Current opinion in Plant Biology*. v.3, p.285-290, 2000.

Yu, I.C., Parker, J., Bent, A.F. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, v.95, p.7819-7824, 1998.

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

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

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

Zaramela, L.S. Caracterização do secretoma de *Phakopsora pachyrhizi* expresso durante a interação com a soja. Viçosa, MG, 83p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, 2011.

Zipfel, C.; Felix, G. Plant and animal: a different taste for microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, v.8, p.353-360, 2005.

Zipfel, C.; Robatzek, S.; Navarro, L.; Oakeley, E.J.; Jones, J.D. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, v.428, p.764-767, 2004.

Zou, J.; Rodriguez-Zas, S.; Aldea, M.; Li, M.; Zhu, J.; Gonzalez, D.O.; Vodkin, L.O.; DeLucia, E.; Clough, S.J. Expression Profiling Soybean Response to *Pseudomonas syringae* Reveals New Defense-Related Genes and Rapid HR-Specific Downregulation of Photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 18, n. 11, p. 1161-1174, 2005.