

PRISCILLA AGUIAR MÖLLER

**ANÁLISE
FUNCIONAL DE GENES DE *Phakopsora pachyrhizi* CANDIDATOS A EFETORES
UTILIZANDO O SISTEMA EDV**

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
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M726a
2014 Moller, Priscilla Aguiar, 1988-
Análise funcional de genes de *phakopsora pachyrhizi*
candidatos a efetores utilizando o sistema EDV / Priscilla Aguiar
Moller. – Viçosa, MG, 2014.
x, 61f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Herminio Brommonschenkel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Phakopsora pachyrhizi*. 2. Soja - Doenças e pragas.
3. Ferrugem-da-soja. 4. Genética molecula. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Mestrado em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 579.59

PRISCILLA AGUIAR MÖLLER

**ANÁLISE
FUNCIONAL DE GENES DE *Phakopsora pachyrhizi* CANDIDATOS A EFETORES
UTILIZANDO O SISTEMA EDV**

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: 29 de julho de 2014.

Jose Rogério de Oliveira

Jorge Luis Badel

Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

*Aos meus pais, Ícaro Möller e
Margiana Rodrigues Aguiar Möller
Ao meu namorado e fiel companheiro nessa jornada
Isaias Severino Cacique,
E a todos os amigos e familiares que sempre torceram por mim
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus. Pela proteção, saúde, por guiar meus passos ao longo desta jornada e colocar pessoas especiais na minha vida. Agradeço a Ele também pelas dificuldades que encontrei, pois apesar de tudo estas me fizeram crescer, amadurecer e ficar mais forte.

Aos meus pais Ícaro e Margiana, por todo apoio ao sair de casa e ir morar longe em busca dos meus objetivos. Obrigada pelo amor incondicional, conselhos, palavras de encorajamento e conforto, e por terem acompanhado cada etapa dessa caminhada ainda que à distância. Essa conquista é para vocês. Agradeço também a todos os familiares.

Aos amigos da Pós-Graduação, em especial aos do mestrado, pela união e companheirismo que sempre reinaram em nossa turma nos momentos de estudo e lazer. A alegria e descontração de vocês tornaram esses momentos inesquecíveis, divertidos e, sobretudo, prazerosos. Gostaria de agradecer em especial ao meu namorado Isaias, a maior bênção que recebi em Viçosa. Obrigada pelo companheirismo sempre, principalmente nas horas mais difíceis, em que esteve sempre do meu lado me dando apoio, trazendo paz, calma e me fazendo mais forte. Obrigada pelo carinho, cuidado, amor e atenção que sempre teve comigo. Ao seu lado, essa trajetória tornou-se mais doce, suave, gostosa e colorida.

Aos amigos do laboratório de Genômica, pela amizade, descontração e apoio. Em especial a Nat, que me acolheu tão bem quando cheguei e que sempre de bom grado me ajudou. Ao pós-doutorando Jorge pelos conhecimentos que com ele adquiri, disposição em me ajudar sempre que precisei e pela paciência em explicar. E aos funcionários que sempre me ajudaram de prontidão, em especial Daniel, Diego, Bernadete e Luís.

Ao orientador Sérgio Hermínio Brommonschenkel pela oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do mestrado. E a estes bem como ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), pela infraestrutura e excelência em ensino e pesquisa a minha disposição.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

E a todos os professores e funcionários que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional durante o mestrado. Em especial ao professor Luis Cláudio pela disposição em me ajudar quando precisei, obrigada pela atenção e contribuição e também ao professor José Rogério pela disposição em ajudar e por ter aceitado participar da banca.

BIOGRAFIA

PRISCILLA AGUIAR MÖLLER, filha de Margiana Rodrigues Aguiar Möller e Ícaro Möller, nasceu em Goiânia - GO, em 16 de março de 1988.

Em março de 2007 ingressou no curso de Bacharelado em Agronomia na Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, graduando-se Engenheira Agrônoma em 16 de março de 2012. Durante a graduação foi bolsista do laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, unidade Embrapa Arroz e Feijão, de novembro de 2009 a outubro de 2011, sob a orientação da pesquisadora Dr^a Adriane Wendland, permanecendo na empresa até janeiro de 2012. Nesse período desenvolveu pesquisas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro. Em novembro de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, nível mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, sob a orientação do professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, atuando na área de Genômica e Genética das Interações Patógeno-Hospedeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A cultura da soja (<i>Glycine max</i> L.).....	4
2.2 A ferrugem asiática da soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>)	5
2.3 Resistência da soja à ferrugem asiática	8
2.4 O sistema imune vegetal e as proteínas efetoras de ferrugens	9
2.5 Translocação de proteínas efetoras utilizando o vetor pEDV	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Obtenção de clones de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 1462, contendo genes de <i>P. pachyrhizi</i> candidatos a efetores corretamente clonados no vetor pEDV6.....	17
3.2 Avaliação da atividade supressora ou ativadora de resposta de defesa em soja, a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de <i>Psg</i> 1462	18
3.2.1 Preparo das plantas de soja.....	19
3.2.2 Preparo da suspensão bacteriana de <i>Psg</i> 1462	19
3.2.3 Inoculação de <i>Psg</i> 1462 em soja por mergulho e método de avaliação	20
3.3 Avaliação da capacidade de indução ou supressão da Reação de Hipersensibilidade (HR) em tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) e <i>Nicotiana benthamiana</i> a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de <i>Psg</i> 1462	21
3.3.1 Preparo das plantas, inoculação e avaliação da HR.....	22
3.4 Dinâmica populacional dos clones de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 1462 contendo diferentes efetores, em soja, tabaco e <i>N. benthamiana</i>	22
3.4.1 Preparo das plantas e do inóculo	23
3.4.2 Inoculação de <i>Psg</i> 1462 para a curva de crescimento em soja.....	23
3.4.3 Amostragem e quantificação da população bacteriana em tabaco, <i>N. benthamiana</i> e soja	24

3.5 Inoculação a vácuo de clones de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 1462 no genótipo Williams 82, para visualização de HR e estudo da dinâmica populacional neste genótipo, visando comprovar sua resistência à <i>Psg</i> 1462.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Atividade supressora ou ativadora de resposta de defesa em soja, a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de <i>Psg</i> 1462.....	26
4.2 Avaliação da capacidade de indução ou supressão da Reação de Hipersensibilidade (HR) em tabaco e <i>N. benthamiana</i> a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de <i>Psg</i> 1462	29
4.3 Dinâmica populacional dos clones de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 1462 contendo diferentes efetores, em soja, tabaco e <i>N. benthamiana</i>	33
4.3.1 Quantificação da população bacteriana em soja.....	34
4.3.1.1 Genótipo PI 587905.....	34
4.3.1.2 Genótipo PI 594538-A e Williams 82	39
4.3.2 Quantificação da população bacteriana em tabaco e <i>N. benthamiana</i>	41
4.4 Inoculação a vácuo de clones de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 1462 no genótipo Williams 82 para visualização de HR	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

MÖLLER, Priscilla Aguiar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Análise funcional de genes de *Phakopsora pachyrhizi* candidatos a efetores utilizando o sistema EDV.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Os fungos causadores de ferrugens são parasitas obrigatórios que secretam diversas proteínas durante sua interação com plantas hospedeiras. Essas proteínas promovem o parasitismo por meio da manipulação do metabolismo do hospedeiro e interferência em suas respostas de defesa. As proteínas efetoras podem ser reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes de resistência da planta, sendo, neste caso, denominadas proteínas de avirulência. Seis locos contendo genes que proporcionam diferentes graus de resistência à *P. pachyrhizi* (*Rpp*) já foram relatados e vários genes que codificam proteínas secretadas por esse fungo já foram identificados. No entanto, ainda não foram identificadas as proteínas efetoras (proteínas Avr) reconhecidas pelas proteínas *Rpp* de soja. Desse modo o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas secretadas por *P. pachyrhizi* (PPUFV02), capazes de ativar ou suprimir respostas de defesa em soja, através de uma análise funcional de 10 genes candidatos a efetores, utilizando o SST3 de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 (sistema EDV). Dos dez efetores testados nos 11 genótipos de soja resistentes ao isolado monopostular de *P. pachyrhizi* PPUFV02, fonte dos genes candidatos, PHPA_RSP_71 se destacou por contribuir para uma maior severidade da doença no genótipo PI 594538-A e menor no genótipo PI 594754. O efector PHPA_RSP_23 também se mostrou interessante para novos estudos funcionais em soja e tabaco, uma vez que os resultados indicaram possível ativação de resposta de defesa em soja de forma geral (em todos os genótipos) e possível supressão de morte celular em tabaco. A atividade efetora desses genes candidatos não foi confirmada pela análise de crescimento bacteriano em soja e em tabaco (planta não hospedeira). Por outro lado, há uma possibilidade de esses efeitos serem devido a uma interferência do efector com a funcionalidade do SST3, necessitando-se de estudos de secreção da proteína para confirmar ou refutar estas hipóteses. De forma geral o genótipo Williams 82 se mostrou resistente à *Psg* 1462, podendo ser utilizado como controle negativo para doença nas análises funcionais. Não foi possível confirmar *N. benthamiana* como uma planta adequada para estudos funcionais de indução/supressão de HR ao se utilizar *Psg* 1462, uma vez que é possível que este isolado bacteriano seja patogênico a esta espécie. O vetor pEDV6 de forma geral apresentou estabilidade nos clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP) e não alterou a capacidade de multiplicação da bactéria *in planta*, confirmando o EDV como um bom sistema para análise funcional de genes de *P.*

pachyrhizi candidatos a efetores em soja, utilizando o SST3 de *Psg* 1462. O método de inoculação por mergulho não se mostrou adequado para as análises funcionais em soja, uma vez que apresentou de forma geral alta variabilidade nos resultados, sendo o método de inoculação a vácuo mais indicado para este fim por ter apresentado maior uniformidade na severidade dos sintomas observados.

ABSTRACT

MÖLLER, Priscilla Aguiar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Functional analysis of *Phakopsora pachyrhizi* effector candidates using the EDV system.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Rust fungi are obligate parasites that secrete diverse proteins during their interaction with host plants. These proteins promote parasitism by manipulating the host metabolism and interfering with its defense responses. Effector proteins can be recognized by proteins coded by plant resistance genes, in which case they are called avirulence proteins. Six loci containing genes that confer varying degrees of resistance to *P. pachyrhizi* (*Rpp*) have been reported, and several genes encoding proteins secreted by the fungus have been identified. However, effector proteins (Avr proteins) recognized by soybean *Rpp* proteins have not yet been identified. Thus, the objective of this study was to identify proteins secreted by *P. pachyrhizi* (PPUFV02) able to activate or suppress defense responses in soybean, through the functional analysis of ten candidate effector genes using the TTSS of *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 (EDV system). Among the ten effectors tested in 11 soybean genotypes resistant to the mono-pustule isolate PPUFV02 of *P. pachyrhizi*, source of candidate genes, PHPA_RSP_71 stood out for contributing to greater disease severity in genotype PI 594538-A and lower in genotype PI 594754. The PHPA_RSP_23 effector was also interesting for additional functional studies on soybean and tobacco, since the results indicated a possible activation of defense response in soybean, in general (all genotypes), and a possible suppression of cell death in tobacco. The effector activity of these candidate genes was not confirmed by analysis of bacterial growth in soybean and tobacco (non-host plant). On the other hand, it is possible that these effects are due to an interference of the effector with the function of the TTSS, making it necessary to conduct protein secretion assays to confirm or reject these hypotheses. Overall, the genotype Williams 82 showed resistance to *Psg* 1462 and can be used as negative control for disease in functional analysis in soybean. It was not possible to confirm *N. benthamiana* as an appropriate plant for functional studies of induction/suppression of HR when using *Psg* 1462, since it is possible that the bacterial isolate is pathogenic to this species. The pEDV6 vector in general was stable in the *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP) clones and did not alter the ability of the bacteria to multiply *in planta*, confirming the EDV as a good system for functional analysis of *P. pachyrhizi* candidate effector genes in soybean using TTSS of *Psg* 1462. The inoculation method by dipping was not suitable for functional analysis in soybean because, in general, showed highly

variable results. The inoculation method by vacuum was the best suited for this purpose, since it introduced greater uniformity in the severity of symptoms observed.

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma leguminosa nativa do leste da Ásia, conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, e atualmente cultivada no mundo inteiro, sendo reconhecida como uma das mais antigas plantas cultivadas do planeta. Os produtos e subprodutos do cultivo da soja são bastante utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos, e também na produção de biocombustíveis e alimentação animal (EMBRAPA SOJA, 2014).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, sendo que o Brasil é autossuficiente na produção, abastecendo o mercado interno e exportando o excedente. O consumo interno está em constante ascensão e a previsão é de que em 2019, 45% do aumento da produção sejam destinados ao mercado interno (MAPA, 2014). Segundo estimativa do mês de junho de 2014 do levantamento da safra brasileira de grãos realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a soja novamente se destaca na safra 2013/14 em relação à área plantada com grãos no país, apresentando um crescimento de 8,5% em relação à safra passada e incremento de 5,6% na produção, o que representa 86.052,2 mil toneladas a mais do grão (CONAB, 2014). O Brasil é o líder nas vendas externas do complexo soja (grão, farelo e óleo), que é o principal gerador de divisas cambiais para o país, com valores anuais que ultrapassam 20 bilhões de dólares. Em 2019, a produção nacional deve representar 40% do comércio mundial do grão e 73% do óleo de soja (MAPA, 2014). A revolução sócio-econômico-tecnológica protagonizada pela soja no Brasil moderno é comparada ao que ocorreu com a cana de açúcar no Brasil colonial e com o café no Império/República (EMBRAPA SOJA, 2014).

Além das restrições climáticas, a produção de soja é limitada por diversos problemas fitossanitários. Entre as doenças de maior impacto e importância atuais se destaca a ferrugem asiática da soja (FAS) cujo agente etiológico é *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), um fungo biotrófico detectado pela primeira vez no Brasil na safra 2001/02 no Paraná (Yorinori & Lazzarotto, 2004). Hoje 13 anos após a entrada do patógeno no país, a FAS encontra-se disseminada em praticamente todas as regiões produtoras de soja, o que acarreta um grande aumento dos custos de produção, uma vez que a aplicação de fungicidas é atualmente o principal método de controle da doença. O chamado “custo da ferrugem asiática da soja” na safra 2012/13, que considera o custo médio dos fungicidas e da operação de

aplicação somados à perda em grãos e arrecadação, foi de 1,94 bilhões de dólares. No total, a ferrugem asiática já custou ao Brasil cerca de 25 bilhões de dólares, com custo médio nos últimos anos ao redor de dois bilhões de dólares por safra (CNA, 2013).

Em virtude dos altos custos com o uso de fungicidas e aos casos de resistência do patógeno aos fungicidas triazóis, observados a partir da safra 2007/08 em semeaduras tardias na região Centro-Oeste e a partir da safra 2008/09 nas demais regiões (Godoy *et al.*, 2012, 2013; FRAC, 2013; FRAC BRASIL, 2014), o desenvolvimento de cultivares de soja comerciais com resistência à *P. pachyrhizi* desponta como uma importante medida de controle para reduzir as perdas na cultura. Fontes de resistência ao patógeno já são conhecidas. Seis locos contendo genes que proporcionam diferentes graus de resistência à *P. pachyrhizi* já foram identificados e são referidos como genes *Rpp* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi*): *Rpp1*, *Rpp1b*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5* e *Rpp6* (Li *et al.*, 2012). No Brasil já foram liberadas cultivares comerciais com resistência à FAS (lesões tipo RB) (TMG, 2014; EMBRAPA SOJA, 2014). Todavia a área plantada com essas cultivares ainda é pequena, em função do menor potencial produtivo comparado com as cultivares convencionais existentes no mercado.

Uma das estratégias de defesa das plantas contra fitopatógenos é a imunidade ativada por efetores ou ETI (*Effector Triggered Immunity*). Esta se baseia no reconhecimento de moléculas efetoras secretadas pelos patógenos no apoplasto ou citoplasma da célula vegetal, que, neste caso, são denominadas proteínas Avr. Esse reconhecimento ocorre através das proteínas R que são codificadas pelos genes de resistência (genes R) do hospedeiro (Flor, 1942). Entretanto, o plantio em larga escala de variedades resistentes, leva à seleção de raças virulentas do patógeno que conseguem suplantar a resistência conferida pelos genes R do hospedeiro. Isto ocorre através de mutações nos genes AVR do patógeno, que resultam em proteínas Avr não mais reconhecidas pelas proteínas R da planta (Jones & Dangl, 2006). Desse modo existe o interesse no desenvolvimento de novas estratégias visando à obtenção de variedades com resistência durável. Acredita-se que a compreensão da fisiologia do parasitismo do patógeno e dos processos moleculares envolvidos na sua interação com o hospedeiro, possam fornecer informações que subsidiem o desenvolvimento dessas variedades e até mesmo de novas estratégias de controle da doença (Webb & Fellers, 2006). Como o reconhecimento das proteínas efetoras por proteínas de resistência do hospedeiro (proteínas R), normalmente resulta na ativação da reação de hipersensibilidade (HR), elas podem ser identificadas por meio de bioensaios capazes de determinar a ocorrência de morte

celular (HR) ou outras respostas de defesa, quando expressas dentro ou direcionadas para células de variedades que contem genes de resistência, como demonstrado por Vleeshouwers *et al.* (2008).

Durante a interação com a soja, *P. pachyrhizi* secreta diversas proteínas efetoras (Zaramela, 2011) com função desconhecida. Abe (2012) demonstrou a possibilidade de identificar proteínas efetoras citoplasmáticas de *P. pachyrhizi*, por meio da expressão destas em *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) e sua posterior transferência para o citoplasma de cultivares de soja resistentes, pelo sistema de secreção tipo III de bactérias (SST3), baseado no vetor pEDV (*Effector Detector Vector*). No entanto são necessários novos estudos de análise funcional de genes promissores, visando identificar e comprovar aqueles que codificam as proteínas Avr do patógeno.

Desse modo, este trabalho teve por objetivo identificar proteínas secretadas por *P. pachyrhizi* (PPUFV02) capazes de ativar ou suprimir respostas de defesa em soja, através da análise funcional em cultivares de soja resistentes, tabaco e *N. benthamiana*, seguida pela quantificação da população bacteriana nestas espécies, utilizando transformantes de *P. savastanoi* pv. *glycinea* isolado 1462, contendo genes de *P. pachyrhizi* candidatos a efetores clonados no vetor pEDV6 (sistema EDV).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja (*Glycine max* L.)

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pertence à família Fabaceae e é originária da Ásia, onde consistia-se de plantas rasteiras que se desenvolviam ao longo de rios e lagos (soja selvagem). O processo de domesticação da soja ocorreu no século XI a.C., a partir de cruzamentos naturais feitos por cientistas chineses (APROSOJA BRASIL, 2014). No entanto o Ocidente ignorou seu cultivo até a segunda década do século XX, quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram a exploração comercial primeiramente utilizando-a como forrageira e em seguida como grão (EMBRAPA SOJA, 2014). Foi em 1919, após o final da Primeira Guerra Mundial, que a soja se tornou um importante item do comércio exterior, sendo que o ano de 1921 é considerado como marco da consolidação da cadeia produtiva da soja mundialmente, uma vez que neste ano foi fundada a *American Soybean Association* (ASA) (APROSOJA BRASIL, 2014).

Em 1882, a soja chegou ao Brasil via EUA, com registros de cultivos experimentais na Bahia. No entanto o marco de introdução da soja no Brasil foi em 1901, quando começaram os cultivos na Estação Agropecuária de Campinas e a distribuição de sementes para produtores paulistas. Em 1914 a soja foi oficialmente introduzida no Rio Grande do Sul (APROSOJA BRASIL, 2014). Em meados dos anos 50, com o estabelecimento do programa oficial de incentivo à triticultura nacional, a cultura da soja foi igualmente incentivada e então sua produção tornou-se economicamente importante para o país. A expansão da soja no Brasil começou nos anos 70, quando a indústria de óleo começou a ser ampliada, sendo responsável pela ampliação da fronteira agrícola principalmente nas regiões Centro-Oeste e Norte nas décadas de 80 e 90 (APROSOJA BRASIL, 2014; EMBRAPA SOJA, 2014). Esta expansão foi possível devido ao desenvolvimento de cultivares adaptadas às diversas regiões do país, transformando milhões de hectares improdutivos em áreas potenciais para o plantio (Sediyama *et al.*, 2009).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, ficando atrás apenas dos EUA. Os principais importadores da soja brasileira são: China, União Europeia, Tailândia, Taiwan (Formosa), Coreia do Sul e Vietnã (CONAB, 2014). Um estudo realizado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP) prevê que se o clima permitir, em 2023 a safra de soja brasileira deverá representar quase 50% das exportações mundiais, e o Brasil se tornará o maior fornecedor mundial de soja. Se isso se confirmar o Brasil somente não ultrapassará o

atual maior produtor do grão, caso haja uma quebra de safra ocasionada, por exemplo, por uma intempérie climática (Outlook FIESP, 2013).

A maior área plantada com a cultura está na região Centro-Oeste (13.883,4 mil hectares), seguida pela região Sul (10.501,3 mil hectares). O estado do Mato Grosso é o maior produtor nacional do grão (27.001,6 mil toneladas, aumento de 14,7% em relação à safra 2012/13), seguido pelo Paraná com 14.740,8 mil toneladas. As exportações de soja brasileiras até maio de 2014, somaram 24,91 milhões de toneladas e o consumo interno foi estimado em 40,08 milhões de toneladas, sendo aproximadamente 28,10 milhões de farelo de soja e 7,11 milhões de litros de óleo (CONAB, 2014). Segundo o MAPA (2014), a indústria nacional transforma por ano cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico, o que contribui para a competitividade brasileira na produção de carnes, ovos e leite.

2.2 A ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)

Assim como ocorre às demais culturas, a soja enfrenta diversos problemas fitossanitários durante seu ciclo, que podem comprometer a produtividade da cultura, bem como a qualidade final do produto. Entre estes, a ferrugem asiática da soja (FAS) é atualmente a doença de maior importância na cultura, sendo considerada a doença foliar mais destrutiva (Yorinori *et al.*, 2005). Nas áreas tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul, perdas de rendimento de 10 a 80% têm sido relatadas (Miles *et al.*, 2011). No Brasil, nas diversas regiões onde a ferrugem asiática foi relatada em níveis epidêmicos, os danos variam de 10% a 90% da produção (Consórcio Antiferrugem, 2014). O agente etiológico é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), que pertence ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Phakopsoraceae (MycoBank, 2014).

O patógeno pode infectar a soja em todos os estádios de desenvolvimento, sendo a fase próxima à floração a mais crítica. Os sintomas iniciais da doença podem aparecer nos pecíolos, vagens e ramos, sendo mais abundantes na face abaxial das folhas, e consistem de pequenas lesões de aspecto encharcado que gradualmente aumentam de tamanho, tornando-se cinzas, castanhas ou marrons. Na face abaxial das folhas é possível ainda observar as urédias, que se rompem liberando os uredósporos (Andrade & Andrade, 2002). À medida que a esporulação aumenta, o tecido da folha ao redor das primeiras urédias adquire coloração castanho-clara (lesão do tipo “TAN”, esporulação abundante, típica de suscetibilidade) ou

castanho-avermelhada (lesão do tipo “RB”, reação de resistência, margens definidas e pouca esporulação). Os sintomas resultam em perda da área fotossintética e desfolha precoce, afetando a formação de vagens e o enchimento de grãos (vagens vazias, com menor peso de grãos, sementes verdes), o que também provoca perda da qualidade do produto final.

O ciclo da doença inicia-se com a disseminação pelo vento dos esporos produzidos em plantas hospedeiras na entressafra, e sua deposição sobre as folhas. Em condições favoráveis, os esporos germinam formando tubo germinativo e apressório. A penetração é direta na epiderme, diferentemente da maioria dos fungos causadores de ferrugens que penetram pelos estômatos. As condições ambientais favoráveis à germinação dos esporos são temperaturas entre 18°C e 26°C e molhamento foliar de no mínimo seis horas (ideal de 12 a 14 horas). A colonização dos tecidos foliares é intercelular com a formação de haustórios. Em condições ótimas de temperatura, cinco dias após a penetração já é possível a visualização dos primeiros sintomas. Passados mais quatro a seis dias, as urédias podem ser vistas e novos esporos começam a ser liberados, sendo que cada urédia permanece produzindo esporos por aproximadamente 21 dias. Estes esporos vão iniciar novas infecções na mesma lavoura ou vão servir como inóculo para outras. Na ausência da cultura, o fungo sobrevive em plantas voluntárias (soja tiguera ou guaxa) ou em hospedeiros alternativos, como a soja perene e o kudzu (Consórcio Antiferrugem, 2014). Diferentemente do que ocorre para a maioria das ferrugens, que comumente apresentam estreita gama de hospedeiros, *P. pachyrhizi* infecta mais de 95 espécies de plantas de mais de 42 gêneros (Bromfield, 1984; Rytter *et al.*, 1984; Ono *et al.*, 1992).

A ferrugem asiática da soja foi descrita primeiramente no Japão em 1902, e em 1914 na Ásia. Nos Estados Unidos, o patógeno foi relatado pela primeira vez em 1994 no Havaí, sendo em seguida relatado em vários países da África e América do Sul (Hartman *et al.*, 2005). Na América do Sul a ferrugem foi constatada pela primeira vez no Paraguai em março de 2001, e já no final de maio do mesmo ano, a doença encontrava-se amplamente disseminada por este país sendo também constatada no Brasil, nas regiões oeste e norte do Paraná (Yorinori & Lazzarotto, 2004). O fato de o patógeno ser disperso pelo vento, somado ao despreparo dos produtores frente à doença nas safras seguintes, culminou na epidemia que se alastrou pelo país acarretando grandes perdas. Hoje, segundo dados do Consórcio Antiferrugem (2014), a doença está atualmente amplamente disseminada por todo o território nacional (Figura 1). Na safra 2013/2014 até o mês de maio foram registrados 396 focos de ferrugem, com maior registro de casos em janeiro (192 casos), principalmente em Goiás

seguido por Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul (Consórcio Antiferrugem, 2014). A ferrugem asiática já causou prejuízo de US\$ 25 bilhões desde a safra 2003/04, somente no Mato Grosso na safra 2012/13 a perda foi da ordem US\$ 1 bilhão (CNA, 2013).



Figura 1 – Registro da ocorrência de focos de ferrugem asiática no Brasil na safra 2013/2014.
Fonte: Consórcio Antiferrugem (2014).

Em 2007, o MAPA instituiu uma Instrução Normativa (Instrução Normativa nº. 02, de 29 de janeiro de 2007) instituindo o Programa Nacional de Controle da Ferrugem Asiática da Soja (PNCFS). Este teve como objetivo fortalecer o sistema de produção agrícola da soja, congregando ações estratégicas de defesa sanitária vegetal com o suporte dado pela pesquisa

agrícola e assistência técnica, na prevenção e controle da doença. Uma das principais consequências dessa normativa foi que os Estados deveriam criar seus Comitês Estaduais de Controle da Ferrugem Asiática da Soja e que as instâncias intermediárias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) em cada Estado, deveriam estabelecer um calendário de semeadura da soja, com um período de pelo menos 60 dias sem a presença de plantas cultivadas ou voluntárias, excluindo-se as áreas de pesquisa científica e de produção de semente genética, devidamente monitoradas e controladas. Este período é chamado de “vazio sanitário”, regulamentado atualmente em 12 Estados brasileiros e estabelecido para cada estado, visando reduzir o inóculo inicial para a safra seguinte, uma vez que *P. pachyrhizi* é um fungo biotrófico e não sobrevive em restos culturais por mais de 60 dias, somente no hospedeiro vivo (Consórcio Antiferrugem, 2014).

2.3 Resistência da soja à ferrugem asiática

A estratégia mais econômica e amplamente desejada para o controle da ferrugem asiática é a utilização de cultivares com resistência durável, em virtude da redução dos custos de produção, facilidade no manejo da cultura e ainda redução do impacto ambiental provocado pelo uso de fungicidas (Garcia *et al.*, 2008). No Brasil foram lançadas cultivares comerciais com resistência parcial à FAS, como as cultivares TMG 7188 RR, TMG 7062 IPRO, TMG 7060 IPRO, TMG 7161 RR, TMG 7262 RR, BRSMG 780 FRR e BRSMG 772, disponíveis na safra 2013/14 (TMG, 2014; EMBRAPA SOJA, 2014). A utilização dessas cultivares permite reduzir os custos de produção, além de permitir uma maior janela de aplicação de fungicidas, flexibilizando o manejo da ferrugem (TMG, 2014).

Seis locos contendo genes que proporcionam diferentes graus de resistência à *P. pachyrhizi* já foram identificados (Miles *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2011) e são referidos pela sigla *Rpp* (Resistance to Phakopsora pachyrhizi): *Rpp1* (Cheng & Chan, 1968; Hidayat & Somaatmadja, 1977; McLean & Byth, 1980; Hartwig & Bromfield, 1983;), *Rpp1b* (Ray *et al.*, 2009), *Rpp2* (Hidayat & Somaatmadja, 1977), *Rpp3* (Bromfield & Hartwig, 1980), *Rpp4* (Hartwig, 1986), *Rpp5* (Garcia *et al.*, 2008), e *Rpp6* (Li *et al.*, 2012) . No entanto, esses genes conferem resistência a somente alguns isolados do patógeno, sendo ineficazes quando desafiados com outros isolados. Até o momento, nenhum gene de resistência que confira resistência específica a todos os isolados de *P. pachyrhizi* foi identificado (Paul & Hill, 2011).

Vale lembrar que a resistência conferida por um único gene não é durável no campo, sendo facilmente suplantada. No Brasil, por exemplo, 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). Soares *et al.* (2009) relataram também a suplantação da resistência conferida pelos genes *Rpp2* e *Rpp4* em alguns cultivos no sul do país.

Diferentes respostas à infecção por *P. pachyrhizi* tem sido observadas em soja (Figura 2): imunidade, lesão do tipo RB (lesão marrom-avermelhada) e lesões do tipo TAN (lesões castanho-claras e esporulantes), típicas de suscetibilidade. O fenótipo de imunidade só tem sido relatado para o gene *Rpp1*, e apenas em caso de isolados específicos (Miles *et al.*, 2011). As lesões RB são caracterizadas pelo crescimento restrito do fungo, menor número de urédias e menor esporulação na área lesionada (Garcia *et al.*, 2008).



Figura 2 - Diferentes fenótipos observados em soja em resposta à inoculação com *P. pachyrhizi*: TAN, lesão com esporulação abundante, típica de suscetibilidade; RB, reação de resistência caracterizada por lesões marrom-avermelhadas com margens definidas e pouca esporulação; IMUNIDADE, reação de resistência caracterizada pela ausência de sintomas visíveis (Adaptado de Milles *et al.*, 2006).

2.4 O sistema imune vegetal e as proteínas efetoras de ferrugens

As plantas durante a evolução com os patógenos, desenvolveram duas estratégias principais para resistirem e sobreviverem aos estresses bióticos (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). A primeira delas é a imunidade ativada por PAMPs (*Pathogen Associated*

Molecular Patterns), também conhecida como PTI (*Pathogen Triggered Immunity*), que consiste no reconhecimento de moléculas conservadas entre categorias de microrganismos, como por exemplo, quitina e flagelina (Jones & Dangl, 2006; de Wit, 2007). Esta primeira estratégia é conhecida como defesa basal e consiste no reconhecimento dos PAMPs pelas proteínas receptoras, denominadas PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), localizadas na membrana plasmática.

Apesar de a PTI ser suficiente para prevenir a infecção por alguns patógenos, outros adquiriram a capacidade de suplantá-la. Isso ocorre através da produção de moléculas efetoras que suprimem a PTI resultando em ETS (*Effector Triggered Susceptibility*). Em resposta à atividade das proteínas efetoras, as plantas evoluíram uma segunda linha de defesa denominada ETI (*Effector Triggered Immunity*). Esta é baseada no reconhecimento de moléculas efetoras, secretadas pelos patógenos no apoplasto ou citoplasma vegetal. As proteínas efetoras reconhecidas pelos genes R são codificadas pelos genes AVR do patógeno, segundo a teoria de Flor (1942). A maioria das proteínas codificadas pelos genes R são receptores intra-celulares com domínios NB (*nucleotide-binding*) e LRR (*leucine-rich repeats*). Esse reconhecimento dos efetores resulta na ativação de rotas de sinalização no hospedeiro, associadas com a produção de espécies reativas de oxigênio, fortalecimento da parede celular, fosforilação de proteínas e ativação transcricional de vários genes envolvidos nas respostas de defesa e na morte celular programada no sítio de infecção (HR), (Dixon *et al.*, 1994).

Segundo Hogenhout *et al.* (2009), efetores são “moléculas secretadas por organismos associados às plantas, que modificam a estrutura e função da célula hospedeira”. Nas interações patógeno-hospedeiro compatíveis, os efetores promovem o parasitismo por meio da supressão e/ou inativação das respostas de defesa da planta e também alteração das funções fisiológicas do hospedeiro. Fungos e oomicetos colonizam os espaços intercelulares das células vegetais, e secretam efetores por meio dos haustórios (Catanzariti *et al.*, 2007; Dodds *et al.*, 2009; de Jonge *et al.*, 2011; Win *et al.*, 2012; Petre & Kamoun, 2014). Outros microrganismos como as bactérias fitopatogênicas, por exemplo, desenvolveram o sistema de secreção tipo III (SST3) que permite a transferência de moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira (Figura 3), lançando-as diretamente no citoplasma (Alfano & Colmer, 2004; Nomura *et al.*, 2005; Skammoti & Ridout, 2005; Chisholm *et al.*, 2006). A principal função destas moléculas é facilitar a liberação de nutrientes da célula vegetal para o espaço intercelular onde a bactéria se encontra, ou suprimir as respostas de defesa do hospedeiro.

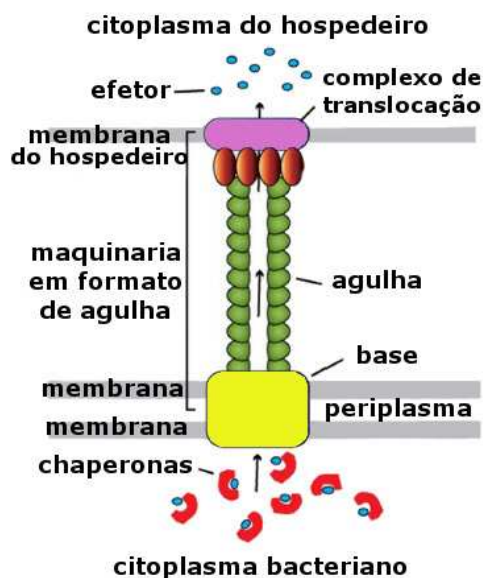


Figura 3 - Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira através do Sistema de Secreção tipo III de bactérias (SST3). Bactérias fitopatogênicas montam essa maquinaria de secreção com o formato de agulha, para injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma da célula hospedeira e assim iniciar a infecção. Caso essas proteínas sejam reconhecidas pelos genes de resistência da planta (R), são denominadas proteínas de avirulência (Avr). A capacidade de injetar efetores em células hospedeiras é essencial para o estabelecimento da infecção e patogênese de muitas bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas* spp. O SST3 é formado por proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais montam o pílus em forma de agulha, que consiste de uma estrutura embutida na membrana basal (amarelo), uma agulha externa que se projeta a partir da membrana externa bacteriana (verde), e um complexo que recobre a ponta da agulha (marrom). Em contato com a célula hospedeira, um complexo de translocação (rosa) é montado entre o complexo na ponta da agulha e a membrana da célula hospedeira, este contém um poro que serve como porta de entrada para a translocação de proteínas efetoras. Após adentrarem o citoplasma do hospedeiro, os efetores (azul) iniciam e mantêm a infecção através da manipulação da biologia da célula hospedeira, alterando a sinalização, o tráfego de secreção e as respostas de defesa. As chaperonas (vermelho) servem como reguladores da secreção, sequestrando efetores e algumas proteínas estruturais dentro do citoplasma bacteriano. (Adaptado de Chatterjee *et al.*, 2013).

As hifas intercelulares dos fungos causadores de ferrugens formam haustórios, estrutura especializada para a absorção de nutrientes. O haustório é uma hifa altamente especializada e circundada por membrana plasmática e parede celular, ao redor do qual se acomoda a membrana plasmática da célula do hospedeiro formando uma membrana extra-haustorial. Na interface entre a parede celular do haustório e a membrana extra-haustorial existe uma camada rica em carboidratos, denominada matriz extra-haustorial.

Os haustórios são também responsáveis pela liberação de proteínas efetoras na matriz extra-haustorial (Figura 4). Estas são translocadas para o interior da célula do hospedeiro,

induzindo alterações estruturais, celulares e bioquímicas (Catanzariti *et al.*, 2007; Petre & Kamoun, 2014). Essa translocação envolve secreção na matriz extra-haustorial e penetração da membrana plasmática do hospedeiro, por um mecanismo ainda desconhecido (Catanzariti *et al.*, 2007; Petre & Kamoun, 2014).

O primeiro gene Avr de fungos causadores de ferrugens clonado e caracterizado, foi o gene AvrL567 de *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2004). Estudos funcionais da proteína AvrL567 demonstraram que esta é sintetizada no haustório e secretada na matriz extra-haustorial. A expressão dessa proteína no citoplasma vegetal induz uma reação de hipersensibilidade dependente das proteínas NBS-LRR L5, L6 ou L7 do linho (*Linum usitatissimum*), sugerindo a existência de um mecanismo de translocação específico que opera durante o processo de infecção.

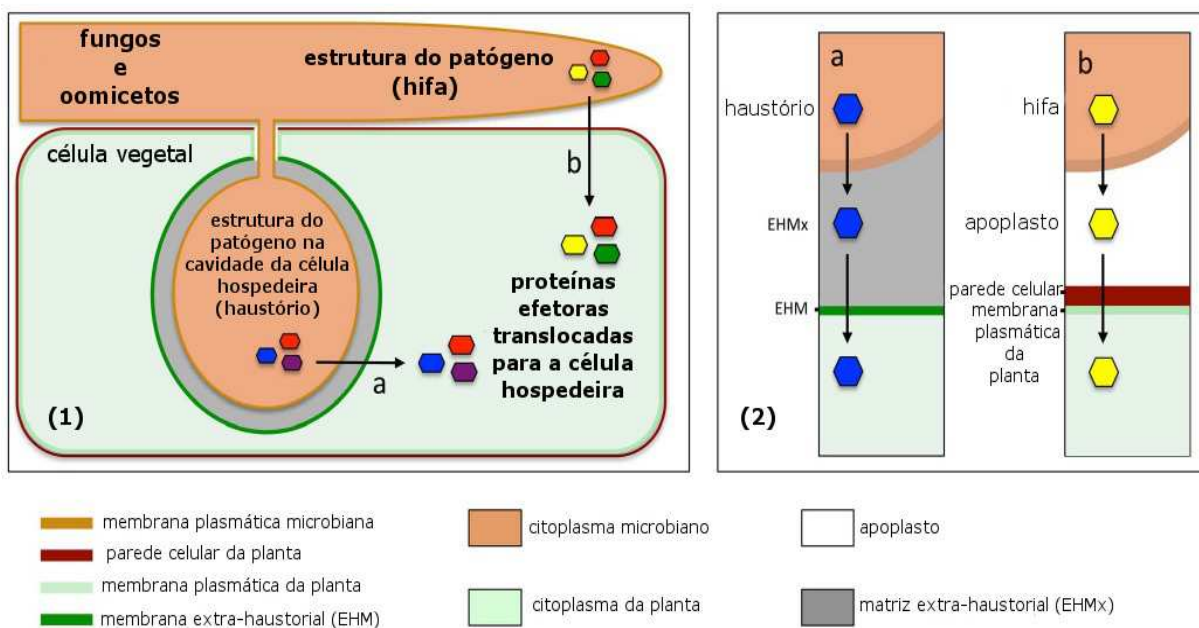


Figura 4 – Estrutura de Fungos e Oomicetos utilizada para secreção de efetores, e pressupostos mecanismos de secreção e translocação. Fungos fitoparasitas e oomicetos produzem estruturas especializadas durante o processo infeccioso: hifas extracelulares, hifas invasoras e haustórios. Os haustórios penetram na cavidade da célula hospedeira e invaginam a membrana plasmática (1), formando a membrana extra-haustorial (EHM – linha verde) e a matriz extra-haustorial (EHMx – cinza). Haustórios (a) e hifas (b) secretam efetores que são translocados no citoplasma da célula hospedeira por meio de mecanismos desconhecidos (2), sendo que a interface biológica enfrentada pelos efetores secretados pelo haustório (a) é diferente da dos efetores secretados pelas hifas (b). Os efetores secretados pelos haustórios (azuis) seguem rotas de secreção (setas) no interior do patógeno, sendo então secretados na interface patógeno-hospedeiro (EHMx – cinza). Atravessam a membrana extra-haustorial (EHM – linha verde), e finalmente entram no citoplasma da célula hospedeira. (Adaptado de Petre & Kamoun, 2014).

Catanzariti *et al.* (2006) efetuaram a caracterização do transcriptoma do haustório de *Melampsora lini*, e identificaram 21 novas proteínas secretadas que foram denominadas HESPs - *haustorium-specific proteins*). Esses autores caracterizaram duas proteínas de avirulência, AvrP4 e AvrM, que são capazes de induzir morte celular programada quando expressas dentro de células vegetais que possuem os genes de resistência *P4* e *M*, respectivamente. Como esses genes de resistência codificam proteínas citoplasmáticas, esses resultados também corroboram um modelo de transferência de proteínas efetoras produzidas no haustório para o interior da célula vegetal, por um mecanismo ainda desconhecido. A expressão e secreção dessas proteínas no haustório, concomitantemente com a indução de HR, fortalecem o papel do haustório na produção de proteínas efetoras (Catanzariti *et al.*, 2007). Esses resultados também ilustram o potencial de se identificar proteínas efetoras reconhecidas por proteínas de resistência do hospedeiro (proteínas R), por meio de bioensaios capazes de determinar a sua capacidade de desencadear morte celular (reação de hipersensibilidade - HR) ou outras respostas de defesa, quando expressas dentro ou direcionadas para o interior das células hospedeiras resistentes, como também demonstrado por Vleeshouwers *et al.* (2008) no estudo de efetores de *Phytophthora infestans*.

2.5 Translocação de proteínas efetoras utilizando o vetor pEDV

Durante a interação com a soja, *P. pachyrhizi* secreta diversas proteínas de função desconhecida (Zaramela, 2011). A análise dos genes que codificam essas proteínas é dificultada pela inexistência de um sistema de transformação estável de *P. pachyrhizi*. Isso impede, por exemplo, o desenvolvimento de sistemas para a geração de mutantes nulos por meio de inativação gênica, mediada por recombinação homóloga. Assim, outra estratégia que pode ser utilizada para a identificação de proteínas efetoras a partir dessas proteínas caracterizadas, é a expressão transiente ou a translocação das proteínas candidatas no citoplasma de variedades resistentes e observação da ativação de respostas de defesa como, por exemplo, a morte celular (Shan *et al.*, 2004; Vleeshouwers *et al.*, 2008). Diversos métodos podem ser utilizados, sendo a translocação de proteínas efetoras utilizando o sistema EDV baseado no SST3, uma técnica bastante promissora para fungos biotróficos (Sohn *et al.*, 2007) (Figura 5).

O sistema EDV foi desenvolvido por Sohn *et al.* (2007) para a translocação das proteínas efetoras ATR1 e ATR13 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (anteriormente

Hyaloperonospora parasitica), oomiceto que provoca o míldio em *Arabidopsis thaliana*, visando verificar o papel destas proteínas durante a interação entre *H. arabidopsidis* e *Arabidopsis*. Os autores desenvolveram um vetor de expressão, denominado pEDV (Effector-Detector Vector), que permite a clonagem de genes candidatos *in frame* com a sequência codificadora do peptídeo de 136 aminoácidos localizado na região N-terminal da proteína efetora AvrRPS4, que sinaliza a secreção pelo SST3 de *Pseudomonas*. No citoplasma vegetal, a porção AvrRPS4 é clivada por uma protease presente na planta, entre o segundo e terceiro G da sequência GGGKRVY, liberando o efector. Este estudo revelou que a translocação das proteínas ATR1 e ATR13 através do SST3 de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*), é capaz de desencadear HR nos genótipos de *Arabidopsis* que contém os genes R correspondentes, respectivamente RPP1-Nd/WsB e RPP13-Nd. Sohn *et al.* (2007) verificaram que os múltiplos alelos dos genes ATR1 e ATR13 contribuíram para um maior crescimento de *Pst* DC3000 em genótipos suscetíveis de *Arabidopsis*.

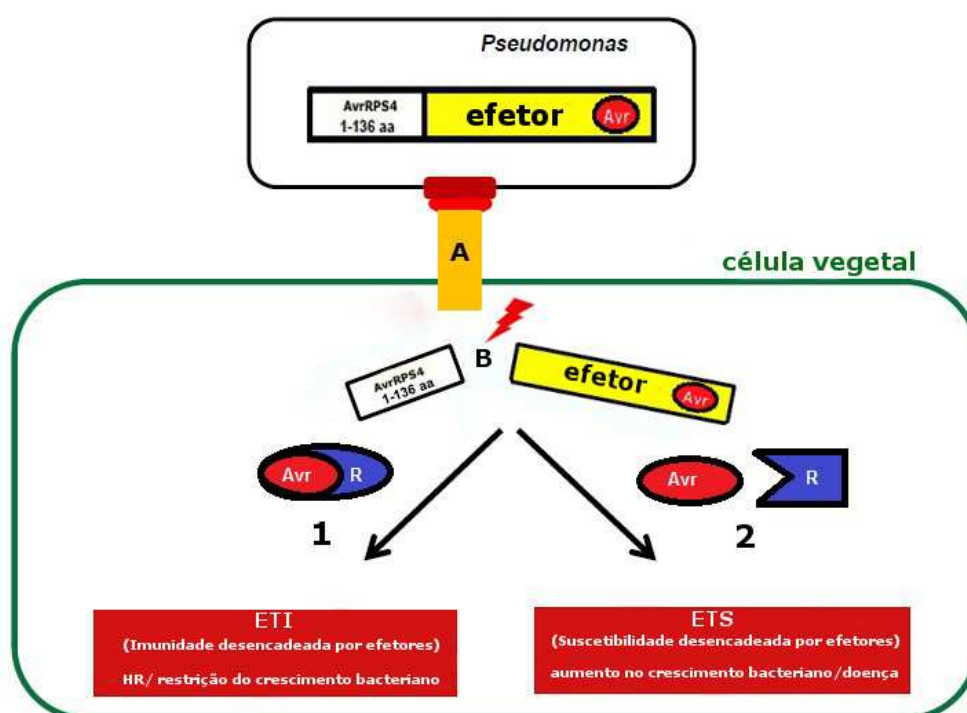


Figura 5 - Representação esquemática do sistema EVD (Effector Detector Vector), desenvolvido por Sohn *et al.* (2007) para a translocação de proteínas efetoras para o citoplasma vegetal mediada pelo SST3 de *Pseudomonas*. O gene que codifica a proteína candidata a efector é clonado *in frame* com a sequência codificadora da extremidade amino terminal da proteína efetora AvrRPS4 de *Pseudomonas*, que direciona a secreção pelo SST3 (A). Ao final da sequência codificadora, está presente uma sequência (GGGKRVY) que é reconhecida por uma protease da planta. Após translocada no citoplasma vegetal, a proteína quimérica AvrRPS4_efector é reconhecida pela protease, ocorrendo uma clivagem entre o

segundo e terceiro G da sequência, liberando a proteína efetora (B). A proteína efetora (Avr) no citoplasma vegetal poderá ser reconhecida pelas proteínas de resistência do hospedeiro (R), desencadeando resposta de defesa na planta (como HR) e restringindo o crescimento bacteriano (1). No entanto, caso a planta não tenha uma proteína R capaz de reconhecer a proteína efetora (2), esta poderá ser capaz de interferir em algum alvo celular, contribuindo para o crescimento da bactéria e desenvolvimento dos sintomas da doença. (Adaptado de Abe, 2012; Maia, 2013).

Fabro *et al.* (2011) também utilizaram o sistema EDV para análise funcional de efetores putativos de *H. arabidopsidis* por meio do SST3 de *Pst* DC3000-LUX, em *Arabidopsis* e em nabo (planta não hospedeira). Neste estudo, 70% dos efetores candidatos contribuíram positivamente para o crescimento bacteriano de *Pst* DC3000-LUX em mais de um acesso de *Arabidopsis* avaliado, o que indica que esses efetores contribuem para uma maior agressividade de *H. arabidopsidis*. De forma geral, grande parte desses mesmos efetores suprimiu a deposição de calose, evidência citológica da ativação da PTI como resultado do reconhecimento de PAMPs. No entanto, nenhum efector foi capaz de induzir morte celular macroscópica típica de HR nos diferentes acessos inoculados, ou seja, Fabro *et al.* (2011) não conseguiram identificar nenhum gene de avirulência.

Com o objetivo de desenvolver métodos para detectar e quantificar rapidamente a contribuição de efetores candidatos de *H. arabidopsidis*, Badel *et al.* (2013) também utilizaram o sistema EDV para translocar efetores via SST3 de *Pst* DC3000. Esses autores inocularam misturas de clones bacterianos expressando diferentes efetores e estimaram a contribuição de efetores individuais, através do cálculo da abundância de cada efector candidato na população bacteriana recuperada a partir de folhas 3 dias após a inoculação, em relação à abundância no inóculo misto inicial, sendo identificados efetores que contribuem positivamente para o crescimento de *Pst* DC3000 em alguns acessos de *Arabidopsis*. Os efetores HaRxLL464, HaRxL75, HaRxL22, HaRxLL441 e HaRxL89 suprimiram PTI, fornecendo evidências da supressão de várias etapas de PTI por oomicetos.

Sharma *et al.* (2013) também utilizaram o sistema EDV para translocar as proteínas efectoras AVR-Pik e AVR-Pii de *Magnaporthe oryzae*, para o citoplasma de arroz, utilizando o SST3 de *Burkholderia glumae*, um patógeno emergente nesta cultura. Diferentemente dos trabalhos anteriores, neste o hospedeiro foi uma espécie monocotiledônea. A translocação de AVR-Pik e AVR-Pii para o citoplasma de cultivares de arroz contendo os genes R cognatos revelou atividade de avirulência. Além disso, o efector AVR-Pik reduziu e atrasou a HR desencadeada por *B. glumae* em *Nicotiana benthamiana* (planta não hospedeira), indicando

uma atividade supressora de morte celular. Esses resultados reforçam o potencial do sistema EDV para elucidar o papel de efetores de fungos durante a interação com plantas hospedeiras e não hospedeiras.

Abe (2012) realizou estudos preliminares visando estabelecer um protocolo de análise funcional de proteínas efetoras de *P. pachyrhizi* candidatas, fundamentado no SST3 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e vetor pEDV6. A inoculação por infiltração a vácuo utilizando a raça 4 de *Psg*, revelou dois genes promissores para estudos futuros mais detalhados e comprovou exequibilidade dessa metodologia para a avaliação funcional de genes candidatos a efetores de *P. pachyrhizi* em genótipos de soja resistentes a este fungo. Entretanto, em função da variabilidade dos resultados da inoculação, Abe (2012) enfatizou a necessidade de aprimorar o método de inoculação, para utilizá-lo na triagem de um grande número de genes candidatos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462, contendo genes de *P. pachyrhizi* candidatos a efetores corretamente clonados no vetor pEDV6

Com base em estudos prévios realizados por Zaramela (2011), foram selecionados 29 genes que codificam proteínas secretadas pelo isolado monopostular de *P. pachyrhizi* PPUFV02. Os genes candidatos foram previamente clonados no vetor de entrada pENTRTM/D-TOPO[®] em *Escherichia coli* pelo sistema Gateway[®] (Invitrogen), sendo posteriormente transferidos para o vetor de destino pEDV6 (Figura 6). Em seguida os clones recombinantes foram transformados por eletroporação, em *P. savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) isolado 1462. O vetor pEDV6 foi gentilmente cedido pelo Dr. Jonathan D. G. Jones do The Sainsbury Laboratory, Inglaterra, e o isolado 1462 de *Psg*, pelo Instituto Biológico.

As sequências clonadas no vetor pEDV6 em *Psg* 1462 foram amplificadas e caracterizadas por sequenciamento pelo método de Sanger, no sequenciador automático MegaBACETM 1000 de 96 capilares (GE Healthcare) do Laboratório de Genômica e Genética de Interações Planta-Patógeno, localizado no BIOAGRO/UFV. As sequências obtidas foram montadas e analisadas com ferramentas de bioinformática. Os clones que apresentaram a sequência do efetor clonada no vetor na orientação correta, com o códon de parada e sem o sinal de secreção e/ou substituições de aminoácidos na proteína codificada, foram utilizados nos estudos funcionais.

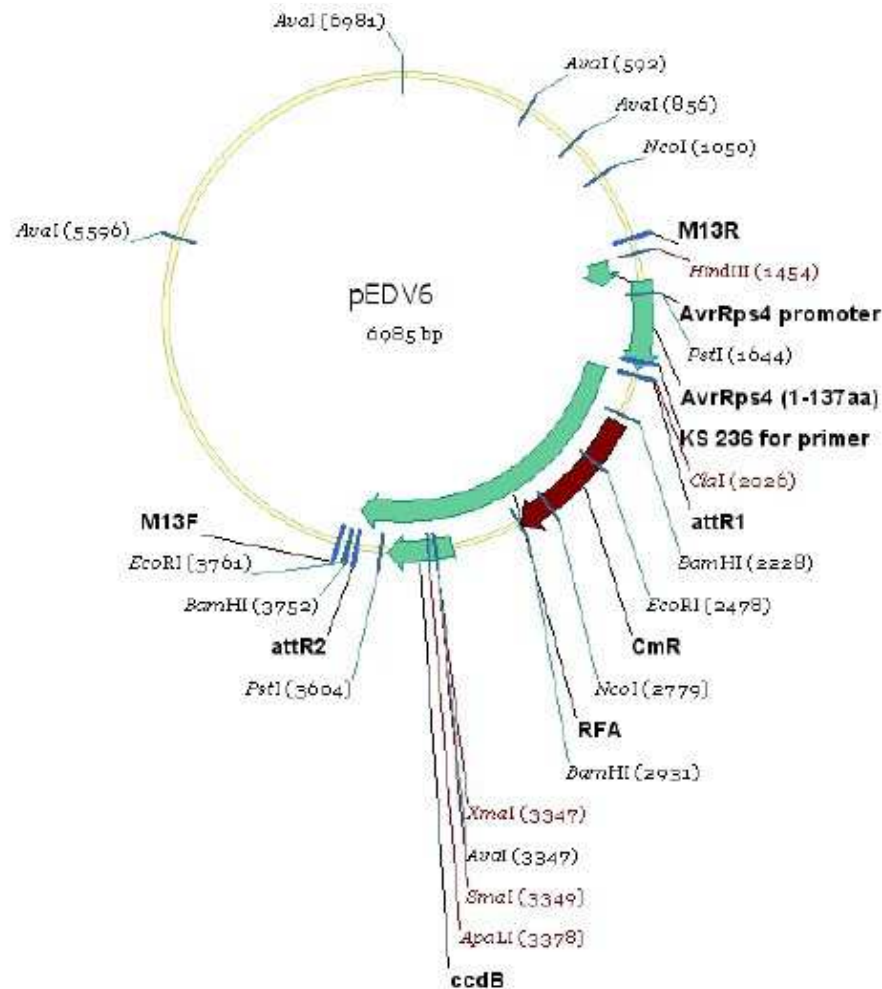


Figura 6 - Mapa do vetor pEDV6, utilizado na expressão e translocação das proteínas codificadas pelos genes candidatos de *P. pachyrhizi* utilizando *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462. AvrRps4 promoter é o promotor do gene que codifica a proteína efetora AvrRPS4 e a região AvrRps4 (1-137 aa) é a sequência que codifica o peptídeo sinal que direciona a secreção pelo SST3. Esse peptídeo é reconhecido e clivado por proteases vegetais na sequência GGGKRYY.

3.2 Avaliação da atividade supressora ou ativadora de resposta de defesa em soja, a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de *Psg* 1462

A análise funcional dos genes de *P. pachyrhizi* candidatos a efetores, cuja clonagem no vetor pEDV6 foi efetivamente confirmada por sequenciamento, foi realizada por meio da inoculação dos transformantes de *Psg* 1462 contendo os diversos efetores (pEDV6::PHPA_RSP), em 11 genótipos de soja resistentes ao isolado monopostular de *P. pachyrhizi* PPUFV02 e suscetíveis à *Psg* (Costa, 2010; Abe, 2012). O genótipo Williams 82 que é suscetível a PPUFV02 e resistente à *Psg* 1462, foi utilizado como controle negativo (ver item 3.5).

Os genótipos inoculados foram: PI 200487 (*Rpp5*), PI 230970 (*Rpp2*), PI 471904 (*Rpp5*), PI 561356, PI 587880-A, PI 587886, PI 587905, PI 594538-A (*Rpp1b*), PI 594754, PI 594767-A, Shiranui (*Rpp5*) e Williams 82. Na análise funcional em soja foram utilizados dez clones de *Psg 1462*: *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_01), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_17), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_29), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_43), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_72), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_77), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_78) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_1276).

3.2.1 Preparo das plantas de soja

Cerca de três dias antes do plantio, sementes de soja foram colocadas em placas de Petri forradas com três folhas de papel germitest, umedecidas diariamente com água destilada e deixadas no escuro para iniciar o processo de embebição das sementes e emissão da radícula (pré-germinação). A seguir as sementes pré-germinadas foram plantadas em vasos de 0,5 litros contendo solo e substrato na proporção 1:2. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até que as folhas primárias e o primeiro trifólio estivessem completamente expandidos e os folíolos apresentassem de 0,5 a 3 cm de tamanho (17 a 21 dias), ou seja, no estágio fenológico V2 (adaptado de Ashfield *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 2005).

No dia anterior à inoculação, o substrato de cada vaso foi coberto com papel alumínio (15 cm x 15 cm) e fita adesiva, deixando somente a parte área exposta, para evitar que o substrato caísse no inóculo durante a inoculação. Em seguida os vasos com as plantas foram deixados em câmara de nevoeiro no escuro por 24 horas antes da inoculação, para promover a abertura estomática (Zou *et al.*, 2005). Cada clone foi inoculado em cinco plantas de cada genótipo.

3.2.2 Preparo da suspensão bacteriana de *Psg 1462*

Os clones da bactéria *Psg 1462* com os genes de interesse, estocados em glicerol a -80°C, foram previamente semeados em placas contendo meio King B (Katagiri *et al.*, 2002) com os antibióticos seletivos rifampicina 100 µg/mL e gentamicina 25 µg/ mL, e incubados em câmaras de crescimento do tipo B.O.D. a 28°C por 72 horas. A bactéria *Psg 1462* não transformada e resistente à rifampicina foi utilizada como controle positivo nas inoculações, sendo semeada em meio King B com rifampicina (100 µg/ mL) e incubada nas mesmas

condições. A partir do inóculo dessas placas, 24 horas antes da inoculação, foram semeadas quatro a cinco placas de cada tratamento e do controle nos respectivos meios seletivos.

No dia da inoculação, adicionou-se solução 10 mM MgCl₂ à cada placa, e após 10 minutos, com auxílio de pipeta *Pasteur* ressuspendeu-se as células bacterianas. Em seguida sedimentou-se as células por centrifugação durante 10 minutos a 5000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. As células bacterianas foram lavadas duas vezes com solução 10 mM MgCl₂ para retirar resquícios do meio de cultura e dos antibióticos. Após a última centrifugação, as células foram ressuspendidas em solução salina e determinou-se a concentração da suspensão bacteriana pela leitura da densidade ótica (OD) no espectrofotômetro Bio-Rad SmartspecTM Plus (Bio-Rad). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para uma OD₆₀₀ = 0,5. Um experimento prévio revelou que para a bactéria *Psg* 1462 a OD₆₀₀ = 0,1 corresponde a 1 x 10⁸ ufc/mL.

Uma alíquota de 10 mL de cada tratamento e do controle foi retirada da suspensão bacteriana preparada na OD₆₀₀ = 0,5 e utilizada posteriormente na infiltração de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e *N. benthamiana*. À suspensão bacteriana restante, foi adicionado o surfactante Silwet L-77 (0,025% do volume a ser inoculado) para quebrar a tensão superficial da folha na inoculação por mergulho, facilitando a penetração da suspensão nos espaços intercelulares. *Psg* 1462 não transformada foi utilizada como controle positivo para indução de sintomas em soja e a solução 10 mM MgCl₂ com Silwet L-77 (0,025%) como controle negativo. O genótipo Williams 82 também foi utilizado como controle negativo para a doença.

3.2.3 Inoculação de *Psg* 1462 em soja por mergulho e método de avaliação

Devido ao quantitativo de plantas a serem inoculadas, em função do número de genótipos, clones e repetições utilizados, as inoculações foram divididas em sete experimentos independentes (épocas distintas), padronizando-se o estágio de inoculação do genótipo e as demais condições de cada experimento. Foram inoculadas cinco plantas de cada genótipo para cada tratamento e três para o genótipo utilizado como controle (Williams 82). As plantas foram retiradas da câmara úmida no escuro somente no exato momento da inoculação. A inoculação foi realizada por tratamento, e consistiu em mergulhar todas as folhas na suspensão de inóculo de forma que o trifólio ficasse totalmente submerso, deixando-as mergulhadas por cerca de três segundos, repetindo o processo três vezes. Imediatamente

após a inoculação, as plantas foram transferidas novamente para a câmara úmida no escuro por 24 horas, para que os estômatos permanecessem abertos facilitando a entrada da bactéria (adaptado de Katagiri *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2007).

Posteriormente, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento a 22°C e 12 horas de fotoperíodo, onde permaneceram por seis dias, sendo em seguida transferidas para a casa de vegetação (adaptado de Ashfield *et al.*, 1995; Budde & Ullrich, 2000; Zou *et al.*, 2005). As avaliações foram realizadas aos 7 e 14 dai (dias após inoculação), nos folíolos do 1° e 2° trifólio completamente expandidos, atribuindo-se notas de 0 a 5 segundo uma representação gráfica de severidade (Figura 7).

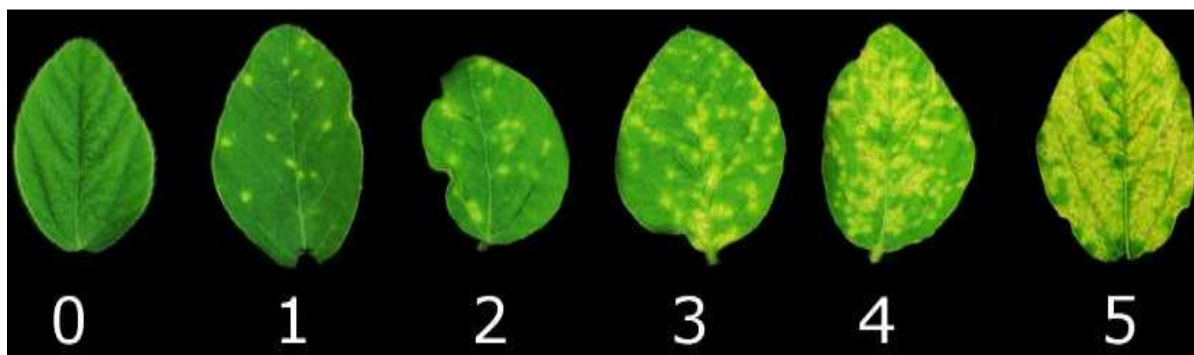


Figura 7 – Escala diagramática para determinação da severidade dos sintomas no folíolo central do primeiro trifólio expandido, dos diferentes genótipos de soja inoculados com *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462, aos 7 dai (dias após inoculação). Os números de 0 a 5 correspondem respectivamente a: 0%, 2,45%, 5,67%, 10,26%, 33,07% e 71% de área foliar afetada. Para desenvolver a escala, folíolos centrais do primeiro trifólio expandido de plantas do genótipo PI 594538-A com diferentes níveis de severidade foram coletados aos sete dias após a inoculação com *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 e processados no *software* Gimp®. A redução do número de cores e quantificação das áreas lesionadas foram realizadas utilizando o *software* QUANT (Vale *et al.*, 2001).

3.3 Avaliação da capacidade de indução ou supressão da Reação de Hipersensibilidade (HR) em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e *Nicotiana benthamiana* a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de *Psg* 1462

Para comprovar a patogenicidade dos candidatos a efetores inoculados em soja (ver item 3.2), e verificar se a expressão das proteínas candidatas em *Psg* 1462 poderia interferir na funcionalidade do SST3, ou atuar como supressoras de morte celular; efetuou-se concomitantemente à inoculação em soja teste de reação de hipersensibilidade (HR) em tabaco cultivar Havana e *N. benthamiana*.

3.3.1 Preparo das plantas, inoculação e avaliação da HR

Sementes de tabaco cultivar Havana e *N. benthamiana* foram semeadas em vasos de 2 litros contendo substrato. Trinta dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos de 1 litro. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C e aproximadamente 12 horas de fotoperíodo antes e após a inoculação.

As mesmas suspensões bacterianas originadas no subitem 3.2.2, foram diluídas para preparar suspensões de cada tratamento e do controle, nas OD₆₀₀ = 1,0; 0,1 e 0,01 conforme descrito no respectivo subitem. Juntamente com as suspensões na OD₆₀₀ = 0,5 anteriormente separadas (sem adição de surfactante), estas suspensões foram inoculadas em folhas de tabaco e *N. benthamiana*. Efetuou-se no mínimo duas repetições biológicas por tratamento. A inoculação foi realizada por meio da infiltração das suspensões bacterianas nos espaços intercelulares da face abaxial da folha, com auxílio de uma seringa descartável de 1 mL sem agulha, de forma a infiltrar toda a área foliar delimitada pela nervura (Thomas *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014).

Cerca de 48 horas após a inoculação, foi verificada a ocorrência de HR (constatação de necrose no tecido infiltrado) ou de supressão de morte celular (ausência de necrose). *Psg* 1462 não transformada foi utilizada como controle positivo de indução de HR em planta não hospedeira e solução 10 mM MgCl₂ como controle negativo.

3.4 Dinâmica populacional dos clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 contendo diferentes efetores, em soja, tabaco e *N. benthamiana*

Nestes experimentos foram utilizados *Psg* 1462 (não transformada) como controle positivo de indução de HR em tabaco e de sintomas em soja, e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71); pois estes comparativamente ao controle positivo, inicialmente apresentaram HR atenuada em tabaco e menor severidade de sintomas em soja (*Psg*1462 + pEDV6::PHPA_RSP_23) ou maior severidade na interação com o genótipo PI 594538-A de soja (*Psg*1462+pEDV6::PHPA_RSP_71). A solução 10 mM MgCl₂ com Silwet L-77 na proporção de 0,025% foi utilizada como controle negativo.

3.4.1 Preparo das plantas e do inóculo

O preparo das plantas e do inóculo foram realizados conforme já descrito nos subitens 3.2.1 (soja), 3.3.1 (tabaco, *N. benthamiana*) e 3.2.2, com a diferença de que neste caso a concentração da suspensão foi ajustada para $OD_{600} = 0,0005$ (aproximadamente 5×10^5 ufc/mL) para determinação da curva de crescimento em soja (adptado de Ashfield *et al.*, 1995; Katagiri *et al.*, 2002), e $OD_{600} = 0,000005$ (aproximadamente 5×10^3 ufc/mL) para a curva de crescimento em tabaco cultivar Havana e *N. benthamiana* (adaptado de Takeuchi *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2013). A suspensão inoculada nestes experimentos foi preparada a partir de uma suspensão bacteriana previamente ajustada para $OD_{600} = 0,4$ para minimizar os erros durante as diluições.

Foram utilizados os genótipos de soja PI 587905 e PI 594538-A, e o método de inoculação por infiltração a vácuo (ver subitem 3.4.2), com três repetições. Para a curva de crescimento em tabaco e *N. benthamiana* o método de inoculação utilizado foi o mesmo descrito no subitem 3.3.1, sendo que dentro da repetição biológica, foi realizado um rodízio da posição internervural inoculada, de forma que todos os tratamentos ocupassem todas as posições de inoculação nas três repetições efetuadas.

3.4.2 Inoculação de *Psg 1462* para a curva de crescimento em soja

Foram inoculadas três plantas para cada binômio tratamento x tempo à exceção do genótipo PI 587905, onde empregou-se quatro. Assim como descrito no subitem 3.2.2, ao inóculo foi adicionado o surfactante Silwet L-77 na proporção de 0,025% do volume a ser inoculado. As plantas foram inoculadas pelo método de infiltração a vácuo após serem embaladas e deixadas previamente em câmara úmida conforme descrito no subitem 3.2.1. (adaptado de Ashfield *et al.*, 1995; Katagiri *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2005 e Wei *et al.*, 2007) Duas a duas, as plantas (parte área) foram mergulhadas na suspensão bacteriana e submetidas ao vácuo durante sessenta segundos. Em seguida o vácuo foi rapidamente liberado, forçando a entrada da suspensão bacteriana pelos estômatos e pelo apoplasto. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro no escuro por 24 horas e em seguida transferidas para câmara de crescimento a 22°C e 12 horas de fotoperíodo, onde permaneceram até o final da amostragem, quando então foram transferidas para a casa de vegetação.

3.4.3 Amostragem e quantificação da população bacteriana em tabaco, *N. benthamiana* e soja

Após a desinfecção superficial da folha com álcool 70%, três discos foliares provenientes de três plantas independentes inoculadas (quatro para PI 587905), foram coletados com auxílio de um furador metálico de 1 cm de diâmetro (adaptado de Budde & Ullrich, 2000; Katagiri *et al.*, 2002). As coletas foram realizadas em intervalos de tempo pré-determinados, com três repetições (PI 587905, quatro). Os discos foram macerados em tubos de microcentrífuga de 2 mL, contendo 750 µl de solução 10 mM MgCl₂ e três esferas metálicas de cinco milímetros de diâmetro cada (Qiagen). Os tubos foram devidamente fechados e agitados em mesa agitadora orbital (Thermo Scientific) a 520 rpm por 20 a 30 minutos para maceração do tecido (adaptado de Ashfield *et al.*, 1995; Budde & Ullrich, 2000; Takeuchi *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013). O macerado obtido foi diluído 1:10 em solução 10 mM MgCl₂ e para cada binômio tratamento x tempo, 20 µl de quatro diluições com as devidas repetições biológicas, foram plaqueadas nos meios seletivos correspondentes (ver subitem 3.2.2) utilizando uma pipeta multicanal. Foram feitas duas repetições técnicas para reduzir os erros devido à pipetagem e influências do meio seletivo no crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em B.O.D. a 28°C, e 48 horas após efetuou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Foram geradas curvas de crescimento bacteriano nas plantas inoculadas transformando-se a contagem do número de colônias obtidos em cada disco, para Log₁₀ ufc/cm² (população bacteriana).

A estabilidade do plasmídeo pEDV na bactéria 1462 durante o crescimento sem seleção *in vitro*, em *N. benthamiana* e no genótipo PI 587905 (soja) também foi avaliada. Para tanto, os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) além de crescidos em meio KB com rifampicina e gentamicina (ver subitem 3.2.2), também foram crescidos em meio KB contendo somente rifampicina, pois a resistência à gentamicina é conferida pelo gene que codifica a gentamicina-3-acetil-transferase, localizado no plasmídeo. Após a contagem das UFCs, efetuou-se a detecção dos plasmídeos por meio da amplificação dos genes candidatos a efetores, utilizando oligonucleotídeos específicos, a partir das colônias recuperadas nas placas, tanto para as placas com rifampicina e gentamicina, quanto para as placas somente com rifampicina.

Para quantificação da população bacteriana em soja a coleta dos discos foliares foi realizada aos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dai (dias após inoculação) para o genótipo PI 587905 (adaptado

de Ashfield *et al.*, 1995) e aos 0, 2, 4, 6, 8 dai para o genótipo PI 594538-A. Para a curva de crescimento em *N. benthamiana* a coleta dos discos foliares foi realizada aos 0, 1, 2 e 3 dai (Sharma *et al.*, 2013) e em tabaco aos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dai. O dia 0 corresponde à coleta imediatamente após a inoculação. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS 9.0.

3.5 Inoculação a vácuo de clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 no genótipo Williams 82, para visualização de HR e estudo da dinâmica populacional neste genótipo, visando comprovar sua resistência à *Psg* 1462

Conforme mencionado no item 3.2, na análise fenotípica da interação dos genes de *P. pachyrhizi* candidatos a efetores com os genótipos de soja resistentes, o genótipo Williams 82 foi utilizado como controle negativo (ausência de doença), uma vez que este é resistente à bactéria *Psg* 1462. Visando provar essa resistência e qualifica-lo como genótipo controle nesses experimentos, e com o propósito de detectar um possível efeito da expressão dos genes PHPA_RSP em *Psg* 1462, na capacidade da bactéria de causar HR neste genótipo, suspensões bacterianas de *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71), *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) e *Psg* 1462 não transformada, foram infiltradas a vácuo no genótipo Williams 82 na OD₆₀₀ = 0,1 (aproximadamente 1 x 10⁸ ufc/mL), (adaptado de Wei *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2009) para verificar a ocorrência de HR 48 horas após a inoculação (hai). Neste experimento, foi feito também uma amostragem de cada tratamento imediatamente após a inoculação, conforme metodologia de coleta e quantificação descrita no subitem 3.4.3, para quantificar o número de UFCs nas folhas inoculadas, visando correlacionar com os sintomas observados. Para comprovar a resistência do genótipo Williams 82 à *Psg* 1462, também foi realizada a curva de crescimento bacteriano após a inoculação por infiltração a vácuo na OD₆₀₀ = 0,0005 (aproximadamente 5 x 10⁵ ufc/mL).

O preparo das plantas para as duas inoculações, o preparo do inóculo, as inoculações e a amostragem e avaliação para a curva de crescimento foram realizados conforme descrito nos subitens: 3.2.1; 3.2.2; 3.4.2 e 3.4.3, respectivamente, sendo que os tempos de coleta para a curva de crescimento no genótipo Williams 82 foram iguais ao do genótipo de soja PI 594538-A. Os controles e os clones utilizados nestes dois experimentos foram os mesmos já descritos no item 3.4.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade supressora ou ativadora de resposta de defesa em soja, a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de *Psg 1462*

Observou-se grande variabilidade na severidade dos sintomas observados nos diferentes experimentos, apesar da padronização das condições de inoculação. Desta forma, comparou-se a severidade da doença apresentada pelos clones de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RPS) àquela apresentada pelo controle positivo (*Psg 1462* não transformada), nos 11 genótipos de soja resistentes a *P. pachyrhizi* PPUFV02 e suscetíveis à *Psg*, e no genótipo Williams 82 (controle), após inoculação por mergulho, em cada interação clone-genótipo. Foram feitas médias das notas de severidade obtidas entre as repetições biológicas para cada interação clone-genótipo. Por meio dessa análise, observou-se maior severidade de sintomas do que o controle positivo (*Psg* não transformada) e demais clones inoculados, no genótipo PI 594538-A inoculado com *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) (Figura 8). Por outro lado, constatou-se uma menor severidade de sintomas no genótipo PI 594754, inoculado com o mesmo clone bacteriano. Já *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) causou menor severidade dos sintomas em todos os genótipos de soja, dentre todos os clones inoculados (Figura 9). Portanto, selecionou-se os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) para estudos mais detalhados de crescimento populacional *in planta*, para averiguar se a maior ou menor severidade da doença estaria relacionado com maior ou menor crescimento bacteriano.



Figura 8 – Fenótipos observados no genótipo PI 594538-A inoculado com os clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462: *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_72), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_77) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_78), em comparação à inoculação com a bactéria *Psg 1462* não transformada (controle), aos 14 dai. A inoculação foi pelo método de mergulho ($OD_{600} = 0,5$), as médias das notas (0 a 5) obtidas nesta análise fenotípica foram respectivamente: 3; 5; 2; 2 e 3. R1 a R4 indicam diferentes repetições. O clone *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) apresentou maior severidade neste genótipo, sendo superior aos demais clones contendo efetores inoculados e ao controle, indicando possível supressão de resposta de defesa em soja.

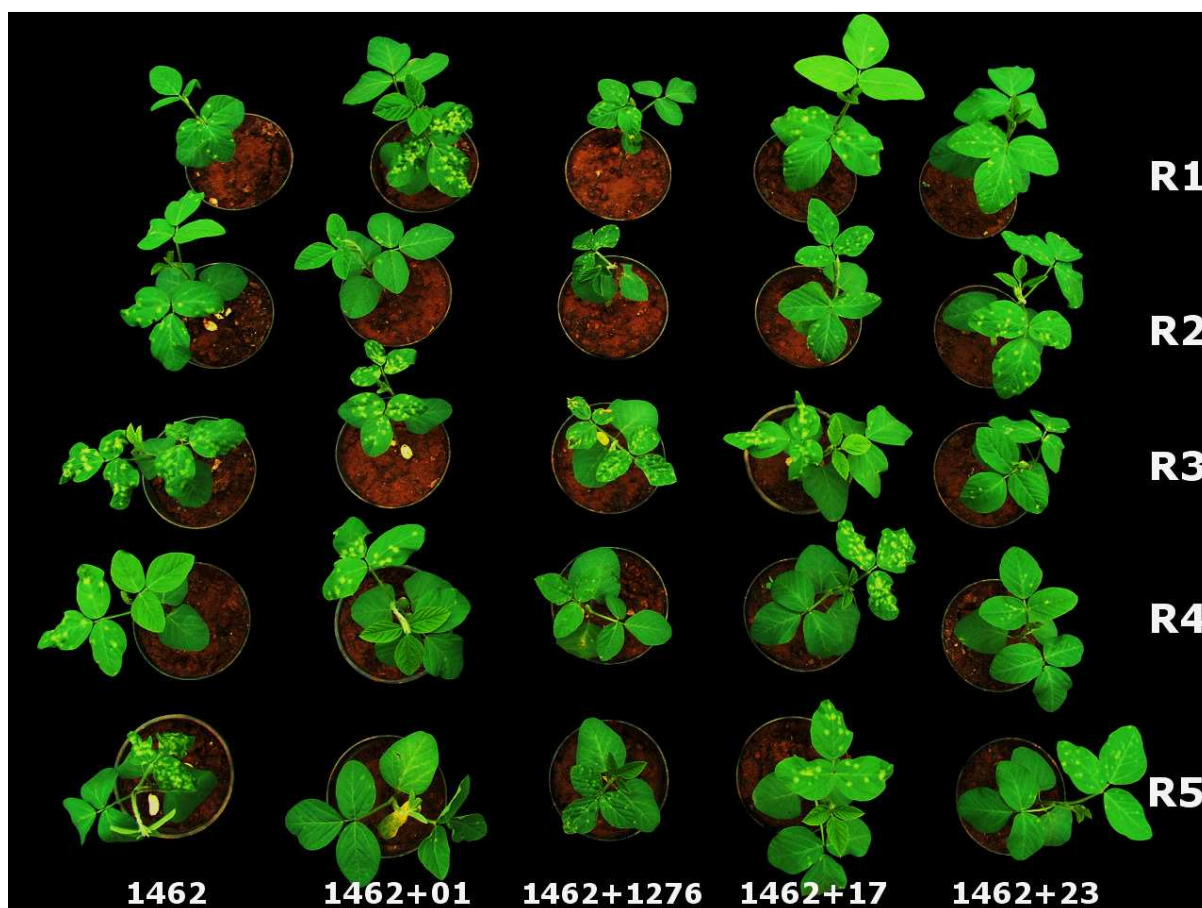


Figura 9 – Fenótipos observados no genótipo PI 587880-A inoculado com os clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462: *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_01), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_1276), *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_17) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23), em comparação à inoculação com a bactéria *Psg 1462* não transformada (controle), aos 14 dai. A inoculação foi pelo método de mergulho ($OD_{600} = 0,5$), as médias das notas (0 a 5) obtidas nesta análise fenotípica foram respectivamente: 3; 2; 1; 2 e 1. R1 a R5 indicam diferentes repetições.

De forma geral os genótipos PI 587886 e PI 587905 foram os mais suscetíveis à inoculação com *Psg 1462* pelo método de mergulho, e os genótipos PI 471904 (*Rpp5*), PI 594754, PI 594767-A e Shiranui, os mais resistentes. O genótipo Williams 82 revelou-se resistente à bactéria *Psg 1462*, uma vez que nenhum dos clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP) inoculados e nem mesmo o controle positivo (*Psg 1462* não transformada), foram capazes de causar doença neste genótipo (Figura 10). O clone *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) foi capaz de provocar pequenas manchas cloróticas em Williams 82, no entanto não houve diferença significativa na severidade da doença em relação ao controle (Figura 10).



Figura 10 – Fenótipos de resistência observados no genótipo Williams 82 inoculado com os clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462: *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_01), *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_1276), *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_17) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23), em comparação à inoculação com a bactéria *Psg* 1462 não transformada (controle), aos 14 dias. A inoculação foi pelo método de mergulho ($OD_{600} = 0,5$), as médias das notas (0 a 5) obtidas nesta análise fenotípica foram respectivamente: 0; 0; 0; 0 e 1. R1 a R3 indicam diferentes repetições. O genótipo Williams 82 revelou-se resistente à *Psg* 1462. Pequenas manchas cloróticas foram observadas na interação do clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) com este genótipo, no entanto não houve diferença significativa em relação ao controle.

4.2 Avaliação da capacidade de indução ou supressão da Reação de Hipersensibilidade (HR) em tabaco e *N. benthamiana* a partir de um protocolo de análise funcional baseado no SST3 de *Psg* 1462

O controle positivo (*Psg* 1462 não transformada) induziu nas duas espécies avaliadas, uma HR bem definida até nas menores concentrações de inóculo infiltradas ($OD_{600} = 0,1$ e $0,01$ respectivamente para tabaco e *N. benthamiana*) (Tabela 1; Figuras 11B e C; Figura 12). Os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP) de forma geral, só foram capazes de induzir uma

HR bem definida em tabaco nas $OD_{600} = 1,0$ e $0,5$ (Tabela 1; Figura 11B). Na menor densidade ótica infiltrada em tabaco ($OD_{600} = 0,01$) não foi observada HR bem definida com o controle positivo, apenas fraco amarelecimento, enquanto que não foi observado nenhum sintoma para os clones *Psg 1462(pEDV6::PHPA_RSP)* (Figura 11A). Em *N. benthamiana*, assim como o controle positivo, todos os clones inoculados foram capazes de induzir HR bem definida em todas as densidades óticas infiltradas (Tabela 1; Figura 12).

O clone *Psg1462(pEDV6_PHPA_RSP_23)* se destacou dos demais na avaliação da capacidade de indução de HR em tabaco. Este, inicialmente e de forma geral, comparativamente ao controle positivo e ao que foi observado com os demais clones *Psg1462(pEDV6_PHPA_RSP)* infiltrados, apresentou ausência de HR ou áreas de HR não contundente (pequenas áreas necróticas esparsas em meio à maior parte do tecido infiltrado sem apresentar sintomas, ou apresentando amarelecimento). Isto foi observado nas densidades óticas mais elevadas, respectivamente $1,0$ (principalmente) e $0,5$ (Figura 11C), em seis das 10 infiltrações realizadas com este clone em tabaco.

Tabela 1 – Ocorrência de Reação de Hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco e *N. benthamiana* infiltradas com diferentes suspensões bacterianas de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP), comparativamente à inoculação com *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 não transformada e à inoculação com solução salina.

Clones candidatos e controles	Tabaco				<i>N. benthamiana</i>			
	OD ₆₀₀				OD ₆₀₀			
	1,0	0,5	0,1	0,01	1,0	0,5	0,1	0,01
MgCl ₂ (10mM) [§]	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psg</i> 1462 [∞]	HR	HR	HR	am	HR	HR	HR	HR
PHPA_RSP_01	HR	HR	-	-	ni	ni	ni	ni
PHPA_RSP_17	HR	HR	at	-	ni	ni	ni	ni
PHPA_RSP_23	NC/HR	NC/HR	-	-	HR	HR	HR	HR
PHPA_RSP_29	ni	ni	ni	ni	HR	HR	HR	HR
PHPA_RSP_43	ni	ni	ni	ni	HR	HR	HR	HR
PHPA_RSP_71	HR	HR	at	-	HR	HR	HR	HR
PHPA_RSP_72	HR	HR	at	-	ni	ni	ni	ni
PHPA_RSP_77	HR	HR	at	-	ni	ni	ni	ni
PHPA_RSP_78	HR	HR	-	-	ni	ni	ni	ni
PHPA_RSP_1276	HR	HR	at	-	ni	ni	ni	ni

HR, Reação de Hipersensibilidade; NC, não contundente; am, amarelecimento; at, HR atenuada; ni, não inoculado; -, nenhum sintoma evidente;

§ Controle negativo para HR (solução salina utilizada no preparo das suspensões bacterianas – 10 mM MgCl₂);

∞ Controle positivo para HR (*Psg* 1462 não transformada).

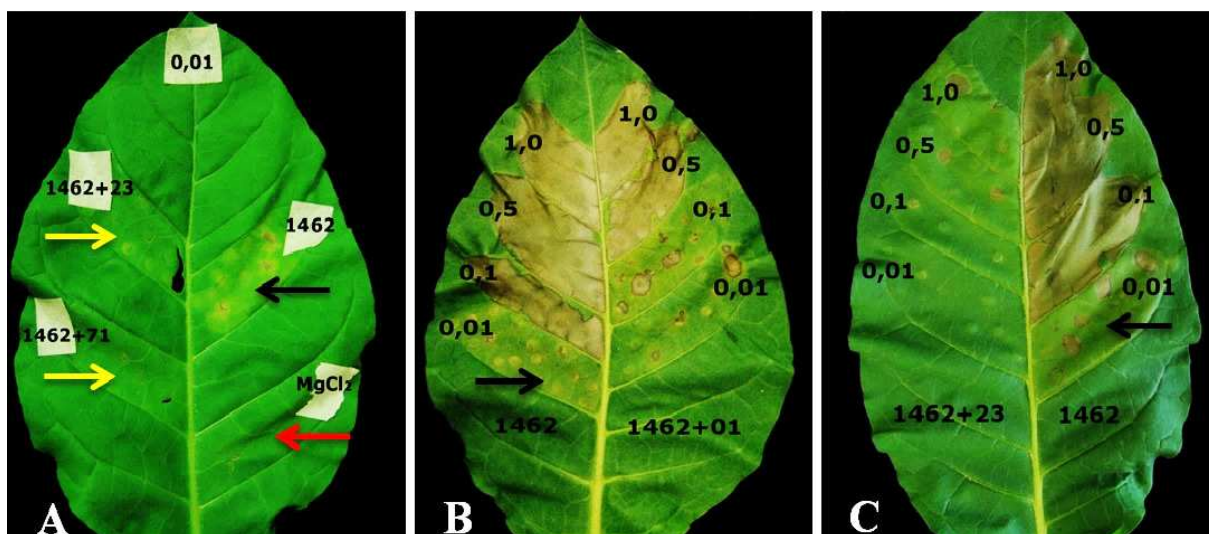


Figura 11 – Sintomas observados em folhas de tabaco após infiltração com 10 mM $MgCl_2$, *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 não transformada e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP), 48 hai. (A) Folha de tabaco infiltrada com suspensões de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) (setas amarelas), *Psg* 1462 não transformada (controle positivo, seta preta) e 10 mM $MgCl_2$ (controle negativo, seta vermelha). As suspensões bacterianas foram infiltradas a $OD_{600} = 0,01$. (B) Reação de uma folha de tabaco à infiltração com suspensões de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_01) e *Psg* 1462 não transformada, a diferentes densidades óticas. (C) Reação de uma folha de tabaco à infiltração com suspensões de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) e *Psg* 1462 não transformada, a diferentes densidades óticas.

O controle positivo (*Psg* 1462 não transformada) não foi capaz de provocar uma HR bem definida em tabaco somente na menor densidade ótica infiltrada ($OD_{600} = 0,01$), provocando apenas um fraco amarelecimento seguido ou não por pequenas necroses esparsas (Figuras 11A, B e C - setas pretas), enquanto os clones contendo efetores, *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) (setas amarelas - Figura 11A), não causaram nenhum sintoma nesta densidade ótica, não se diferenciando do controle negativo (solução salina – seta vermelha). HR bem definida na inoculação com os clones contendo efetores foi observada somente até $OD_{600} = 0,5$ (Figura 11B). HR não confluenta foi observada nas folhas de tabaco infiltradas com *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) (Figura 11C).

Não foi possível detectar indução ou supressão de HR em *N. benthamiana* pelos clones candidatos expressos em *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462, uma vez que todos os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP) infiltrados induziram HR bem definida em todas as

densidades utilizadas (Figura 12), semelhantemente ao controle positivo. Este resultado demonstra uma resposta de hipersensibilidade muito forte a *Psg 1462* em *N. benthamiana*.

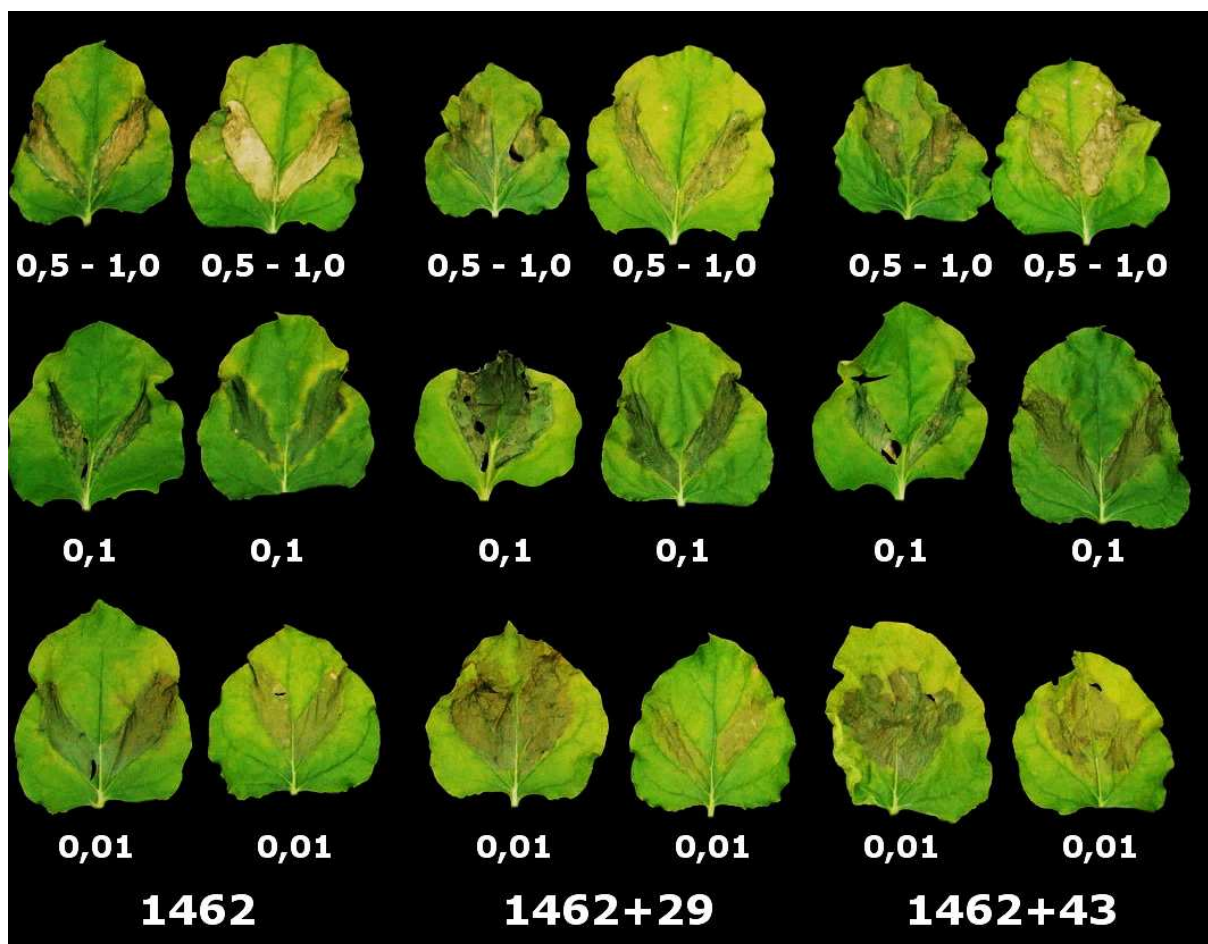


Figura 12 - Reação de Hipersensibilidade em folhas de *N. benthamiana* após infiltração com *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 não transformada e os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_29) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_43), 48 hai. São apresentados os sintomas observados em duas folhas infiltradas com cada clone e o controle para as OD₆₀₀ = 1,0; 0,5; 0,1 e 0,01. As folhas da parte superior foram infiltradas com suspensões nas densidades óticas: 1,0 (lado direito) e 0,5 (lado esquerdo). Nota-se que todos os clones inoculados apresentaram HR bem definida em todas as suspensões bacterianas infiltradas (o que também ocorreu para os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23), semelhantemente à *Psg 1462* não transformada.

4.3 Dinâmica populacional dos clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 contendo diferentes efetores, em soja, tabaco e *N. benthamiana*

Com o objetivo de detectar uma possível contribuição (positiva ou negativa) dos genes PHPA_RSP na interação de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 com seus hospedeiros

suscetíveis e resistentes de soja, e também com plantas não hospedeiras (tabaco e *N. benthamiana*), o crescimento populacional de *Psg* 1462 expressando os candidatos a efetores foi comparado com crescimento de *Psg* 1462 não transformada.

4.3.1 Quantificação da população bacteriana em soja

O crescimento populacional de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 expressando os candidatos a efetores PHPA_RSP_23 e PHPA_RSP_71 em dois genótipos de soja susceptíveis a *Psg* 1462 (PI 587905 e PI 594538-A) e em um resistente (Williams 82), foi comparado ao de *Psg* 1462 não transformada.

4.3.1.1 Genótipo PI 587905

Na Figura 13A pode ser visualizado o gráfico da curva de crescimento bacteriano no genótipo PI 587905 com *Psg* 1462 não transformada (controle) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). E na Figura 13B podem ser observadas as populações bacterianas (Log_{10} ufc/cm²) obtidas em cada tempo amostrado, para os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) crescidos em meio de cultura somente com rifampicina e em meio com rifampicina e gentamicina. Este genótipo foi um dos mais susceptíveis a *Psg* 1462 na inoculação por mergulho na suspensão bacteriana.

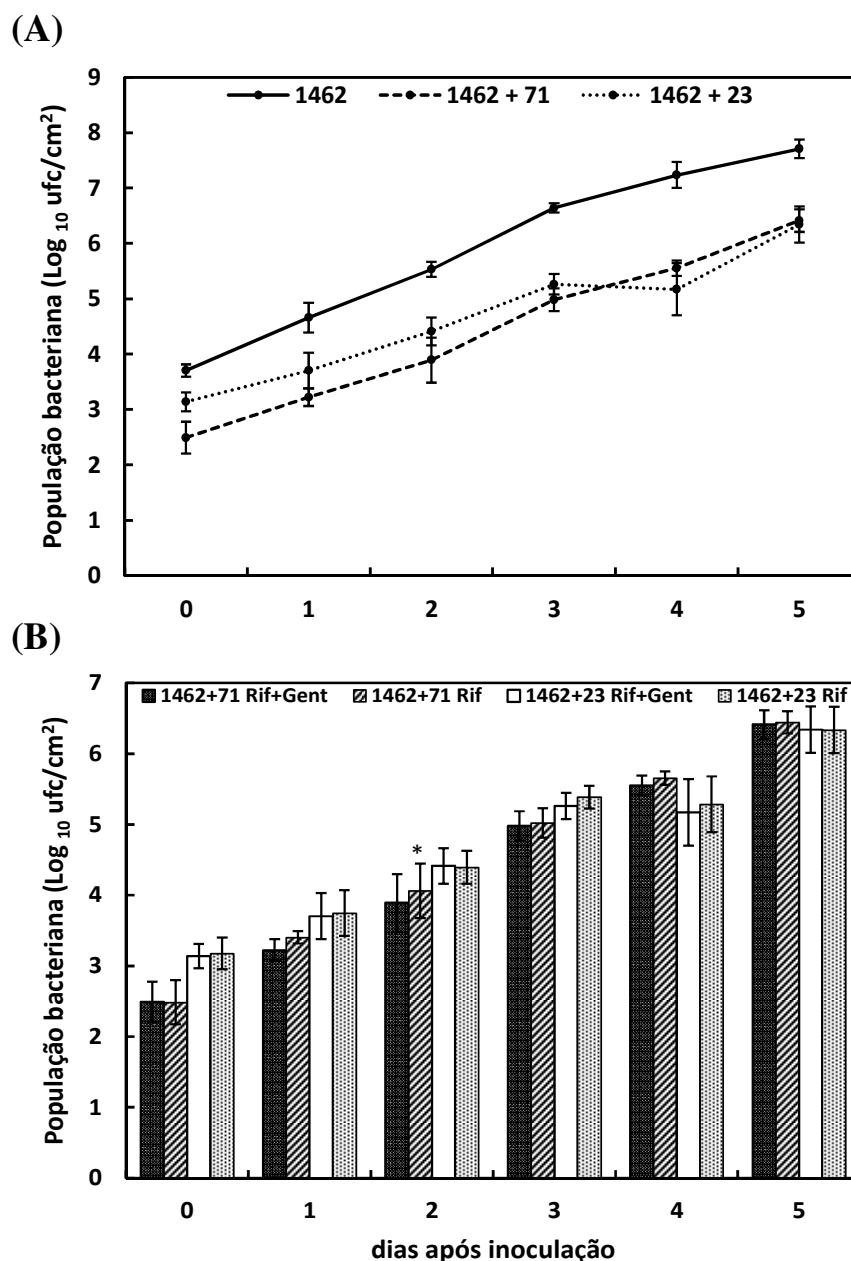


Figura 13 – Quantificação da população bacteriana no genótipo de soja PI 587905, a partir da inoculação a vácuo com *Psg* 1462 não transformada (controle) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). As plantas foram inoculadas a vácuo com uma suspensão na OD₆₀₀ = 0,0005 (aproximadamente 5 x 10⁵ ufc/mL). Amostras do tecido inoculado foram coletadas aos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dai. Cada ponto representa a média de quatro amostras independentes. As barras correspondem ao erro padrão. (A) Curva de crescimento bacteriano. (B) População bacteriana em cada tempo amostrado, para os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) crescidos em meio de cultura somente com rifampicina (100 µg/mL) e em meio de cultura com rifampicina e gentamicina (25 µg/mL). O asterisco indica diferença significativa entre os dois meios de cultura para o mesmo clone bacteriano e dai, pelo teste t a 5%.

Considerando individualmente a população bacteriana obtida para cada um dos dias avaliados, houve diferença significativa pelo teste t a 5%, entre *Psg* 1462 não transformada e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP), para todos os dias avaliados. Sendo a população bacteriana de *Psg* 1462 > *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e a população bacteriana de *Psg* 1462 > *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). No entanto não houve essa diferença significativa entre os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). Essa diferença pontual na população bacteriana que se manteve durante toda a curva de crescimento entre o controle e os clones *Psg*1462(pEDV6_PHPA_RSP), é explicada pelo fato de a própria população bacteriana inicial ter sido estatisticamente diferente entre o controle e os demais clones (Figura 13A).

Desse modo, para verificar se houve diferenças no crescimento bacteriano no genótipo PI 587905 (Figura 13A), foi realizado um teste t a 5% utilizando o programa SAS 9.0, considerando a curva de crescimento como um todo (população bacteriana inicial – população bacteriana final) e o crescimento ao longo dos dias para cada intervalo. Não houve diferença significativa no crescimento bacteriano *in planta* entre o controle (*Psg* 1462 não transformada) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP) avaliados, e nem entre *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). Este resultado foi observado tanto para a curva gerada para os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) a partir de contagens realizadas em placas com meio de cultura contendo somente rifampicina 100 µg/mL, quanto a partir de placas contendo rifampicina e gentamicina 25 µg/ mL. Nota-se que a população bacteriana de todos os clones apresentou tendência de continuidade de crescimento no 5º dia avaliado.

De forma geral não houve diferença significativa pelo teste t a 5% na multiplicação bacteriana em soja inoculada com os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) crescidos em meio de cultura somente com rifampicina e em meio com rifampicina e gentamicina (Figura 13B). Houve a amplificação dos genes efetores em todas as colônias selecionadas em meio de cultura contendo rifampicina ou rifampicina + gentamicina, indicando estabilidade do plasmídeo pEDV6, na ausência de seleção em meio de cultura e durante a multiplicação da bactéria na planta (Figura 14).

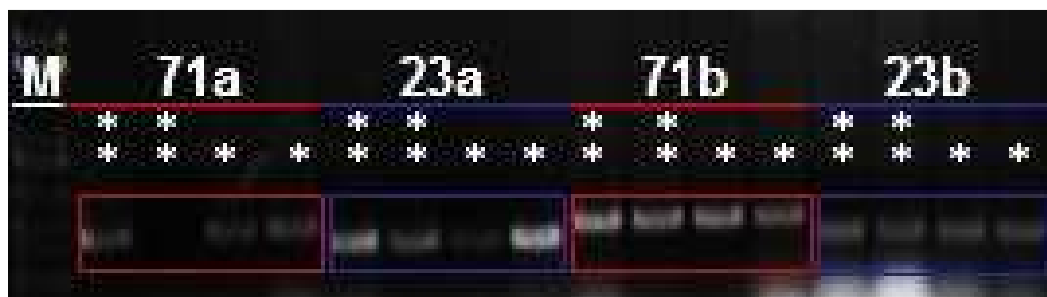


Figura 14 – Amplificação por PCR dos genes efetores clonados no vetor pEDV6 a partir de colônias dos clones *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* e *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)*. M, marcador 1kb plus; a e b, colônias provenientes da contagem respectivamente aos 1 e 2 dai na curva de crescimento em soja genótipo PI 587905; *, placas contendo o antibiótico rifampicina; **, placas contendo o antibiótico rifampicina e gentamicina; 71, *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* (aproximadamente 489 pb); 23, *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)* (aproximadamente 426 pb).

De forma geral, as plantas inoculadas no genótipo PI 587905 apresentaram sintomas, e estes foram observados com maior severidade no controle (*Psg 1462* não transformada) em relação às plantas inoculadas com os clones *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP)*. Os sintomas se iniciaram por volta do 4º dia após a inoculação, sendo que *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)* causou menor severidade de sintomas. Houve melhor uniformidade dos sintomas entre as repetições, em relação ao que foi observado nas inoculações por mergulho. Algumas plantas inoculadas apresentaram lesões necróticas parecidas com HR, manchas castanho-avermelhadas ou manchas brancas e amareladas no 2º e 3º dai (Figura 15), que não condizem com os sintomas típicos provocados por *P. savastanoi* pv. *glycinea* em folhas de soja (Figura 16). Isto foi observado principalmente nas plantas inoculadas com *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)* (lesões necróticas e castanho-avermelhadas), no entanto também foi observado em algumas plantas inoculadas com o controle positivo (*Psg 1462* não transformada) e com *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)*.

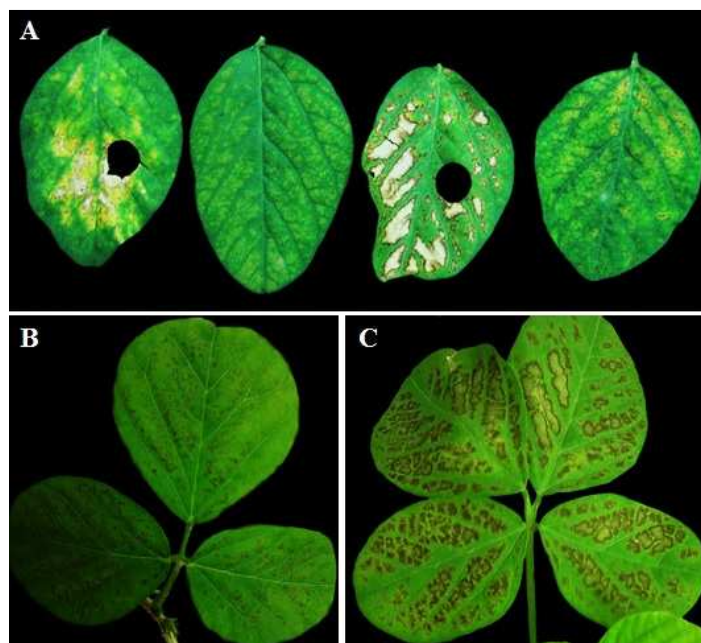


Figura 15 - Lesões não condizentes com sintomas de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 em folhas de soja, observadas na inoculação a vácuo com $OD_{600} = 0,0005$ para as curvas de crescimento bacteriano nos genótipos PI 587905, PI 594538-A e Williams 82. (A) lesões necróticas e manchas brancas e amareladas; (B) manchas castanho-avermelhadas; (C) lesões de fitotoxidez pelo Silwet L-77. As lesões foram observadas a partir do 2º e 3º dai, em algumas plantas de todos os genótipos e para todas as suspensões inoculadas: controle positivo (*Psg* 1462 não transformada), controle negativo (10 mM $MgCl_2$ +Silwet L-77) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23).

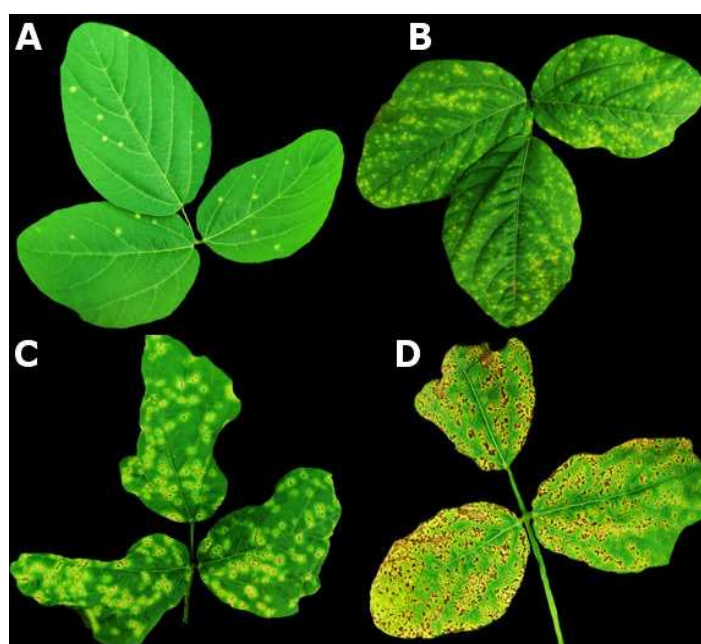


Figura 16 – Diferentes sintomas observados em folíolos de soja dos genótipos PI 587905 e PI 594538-A, após inoculação a vácuo com *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 na $OD_{600} = 0,0005$. Os sintomas iniciaram por volta do 4º dai, e consistiram de pequenas manchas

circulares amareladas (A) e (B) que posteriormente apresentaram manchas amarronzadas no centro (C) e (D). Em seguida essas lesões aumentaram de tamanho e quando numerosas, coalesceram, formando grandes áreas irregulares de coloração marrom rodeadas por áreas cloróticas (D), que em casos mais severos ocupavam toda a extensão do limbo foliar.

4.3.1.2 Genótipo PI 594538-A e Williams 82

Na Figura 17 podem ser visualizados os gráficos das curvas de crescimento bacteriano nos genótipos PI 594538-A (Figura 17A) e Williams 82 (Figura 17B), com o controle (*Psg* 1462 não transformada) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). As figuras mostram resultados de dois experimentos independentes.

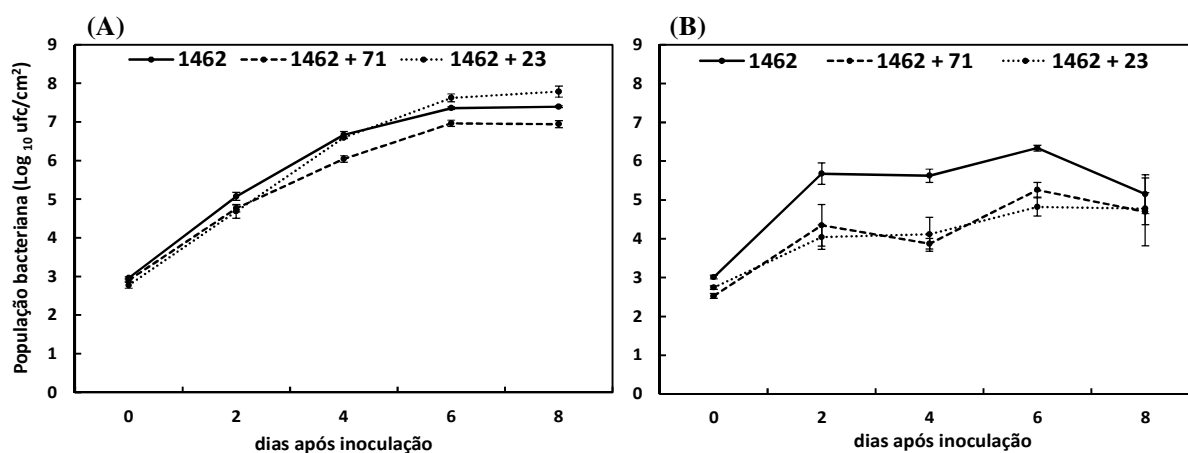


Figura 17 – Crescimento de *Psg* 1462 não transformada (controle) e dos clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) nos genótipos de soja PI 594538-A e Williams 82. As plantas foram inoculadas a vácuo com uma suspensão na OD₆₀₀ = 0,0005 (aproximadamente 5 x 10⁵ ufc/mL). Amostras do tecido inoculado foram coletadas aos 0, 2, 4, 6 e 8 dai. Cada ponto representa a média de três amostras independentes. As barras correspondem ao erro padrão. (A) Curva de crescimento bacteriano no genótipo PI 594538-A. (B) Curva de crescimento bacteriano no genótipo Williams 82.

Não houve diferença significativa entre o crescimento de *Psg* 1462 não transformada e o do clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) no genótipo 594538-A (Figura 17A), considerando a curva de crescimento como um todo (população bacteriana inicial – população bacteriana final) e o crescimento ao longo dos dias para cada intervalo. No entanto comparando-se o clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) com o controle, houve diferença significativa, sendo que *Psg* 1462 não transformada cresceu mais em cada intervalo ao longo

dos dias, assim como apresentou maior crescimento geral. Comparando os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP) entre si, só não houve diferença significativa no crescimento bacteriano entre os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) no genótipo 594538-A, até o 2º dia. A partir do 2º dia as populações bacterianas de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) foram maiores do que as obtidas para *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71), observando-se menor crescimento de *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) neste genótipo.

Não houve diferença significativa entre o controle e os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP), e nem entre *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) quanto ao crescimento no genótipo Williams 82 (Figura 17B), quando comparou-se o crescimento geral (população bacteriana inicial – população bacteriana final). No entanto analisando os intervalos, observou-se diferença entre o controle e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) considerando o crescimento até o 4º e até o 6º dia, sendo observado maior crescimento do controle (*Psg 1462* não transformada). Isto também ocorreu entre o controle e *Psg1462* (pEDV6::PHPA_RSP_23), considerando o crescimento até o 2º e até o 6º dia, sendo que a bactéria *Psg 1462* não transformada também cresceu mais.

De forma geral, observou-se menor crescimento bacteriano no genótipo Williams 82 (Figura 17B) em comparação aos genótipos PI 594538-A (Figura 17A) e PI 587905 (Figura 13A). Os maiores picos populacionais (Log_{10} ufc/cm²) atingidos no genótipo Williams 82 foram 6,34 (controle), 5,26 *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e 4,82 *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23), atingidos somente no 6º dia, culminando em uma queda populacional em seguida. Populações bacterianas similares foram atingidas nos genótipos PI 587905 (mais suscetível) e PI 594538-A, entre o 2º e 4º dia após inoculação, ou seja, bem mais cedo. Nota-se ainda, que no genótipo PI 594538-A houve uma tendência de estabilização do crescimento bacteriano entre o 6º e o 8º dia, e que no genótipo Williams 82 o crescimento foi relativamente estável durante o período avaliado, sendo o pico populacional atingido no 6º dia, apresentando um decréscimo no 8º dia.

De modo similar ao genótipo PI 587905, as plantas do genótipo PI 594538-A apresentaram sintomas que se iniciaram entre o 4º e 6º dia após a inoculação, no entanto a severidade em geral foi menor que a observada no genótipo PI 587905. Isto foi observado para o controle (*Psg 1462* não transformada) e para os dois clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP) inoculados, sendo a maior severidade observada para o controle. Lesões não condizentes com sintomas de *P. savastanoi* pv. *glycinea* em folhas de

soja (Figura 15) observadas anteriormente no genótipo PI 587905, também foram observadas no genótipo PI 594538-A nas mesmas condições, e em maior intensidade e em praticamente todas as plantas inoculadas, no genótipo Williams 82. No entanto neste último, não foram observados sintomas típicos provocados por *P. savastanoi* pv. *glycinea* em folhas de soja nas plantas inoculadas (Figura 16).

4.3.2 Quantificação da população bacteriana em tabaco e *N. benthamiana*

Na Figura 18 podem ser visualizados os gráficos das curvas de crescimento bacteriano em *N. benthamiana* (Figura 18A) e tabaco (Figura 18B), bem como o gráfico com as populações bacterianas (Log_{10} ufc/cm²) obtidas em cada tempo amostrado em *N. benthamiana*, para os clones *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) crescidos em meio de cultura somente com rifampicina e em meio com rifampicina e gentamicina (Figura 18C) .

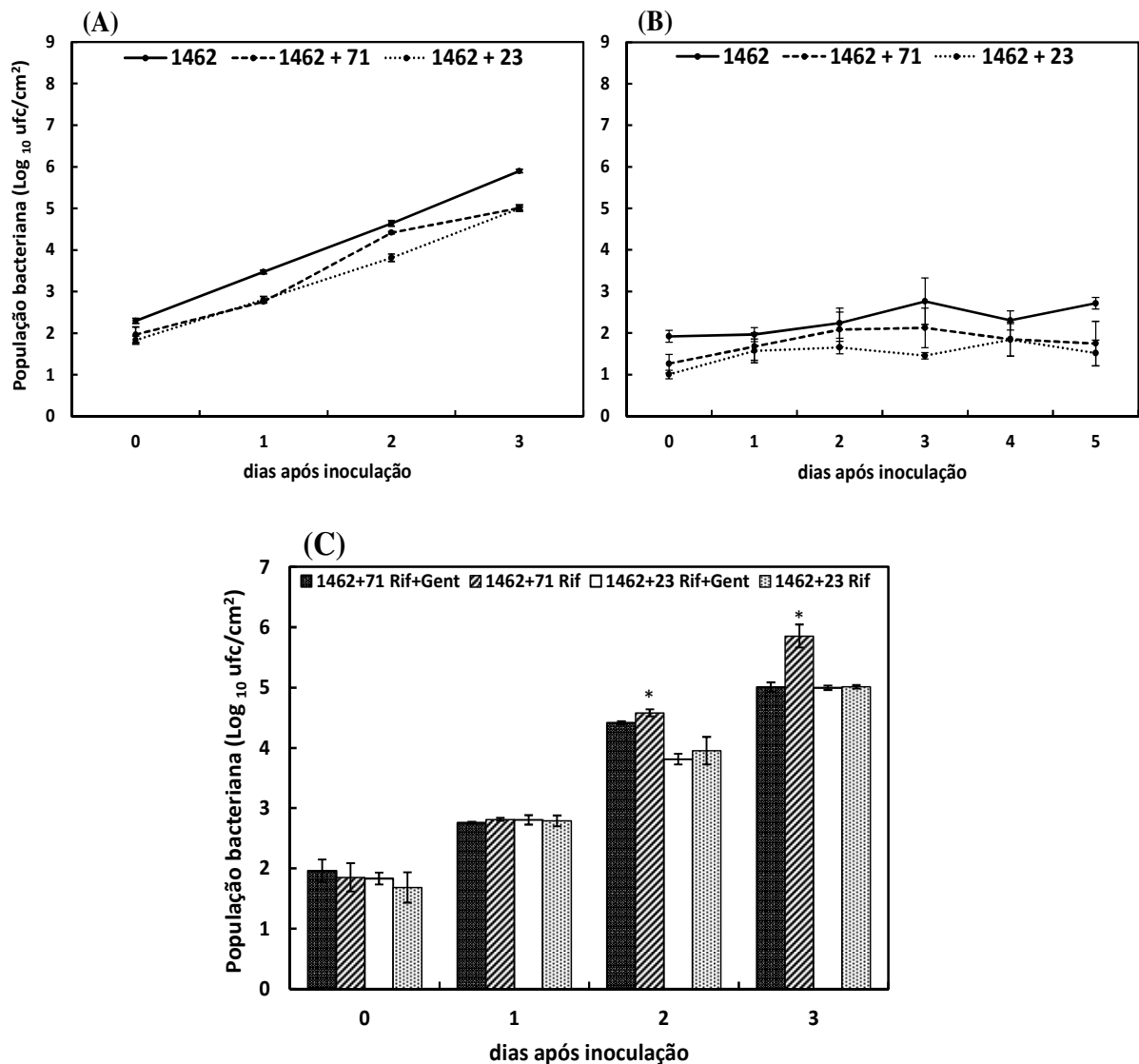


Figura 18 - Crescimento bacteriano em *N. benthamiana* e tabaco, a partir da infiltração com *Psg* 1462 não transformada (controle) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). As plantas foram infiltradas com uma suspensão bacteriana a $OD_{600} = 0,000005$ (aproximadamente 5×10^3 ufc/mL). Amostras do tecido inoculado foram coletadas aos 0; 1; 2 e 3 dai para *N. benthamiana*, e aos 0; 1; 2; 3; 4 e 5 dai para tabaco. Cada ponto representa a média de três amostras independentes. As barras correspondem ao erro padrão. O asterisco indica diferença significativa pelo teste t a 5%. (A) Curva de crescimento bacteriano em *N. benthamiana*. (B) Curva de crescimento bacteriano em tabaco. (C) População bacteriana em cada tempo amostrado em *N. benthamiana*, para os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) crescidos em meio de cultura somente com rifampicina e em meio com rifampicina e gentamicina.

Não houve diferença significativa entre o controle (*Psg* 1462 não transformada) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP) infiltrados, e nem entre os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) em *N. benthamiana*

(Figura 18A), considerando a curva de crescimento como um todo (população bacteriana inicial – população bacteriana final) e o crescimento ao longo dos dias para cada intervalo. Este resultado foi observado de forma geral, tanto para os clones *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* e *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)* quantificados a partir de contagens realizadas em placas com meio de cultura contendo somente rifampicina 100 µg/mL, quanto a partir de placas contendo rifampicina e gentamicina 25 µg/ mL. Nota-se que todos os clones inoculados em *N. benthamiana* apresentaram tendência de aumento de crescimento no 3º dia avaliado, sendo obtidas no 3º dia populações bacterianas aparentemente elevadas para um crescimento em planta não hospedeira: 5,89 (*Psg 1462* não transformada); 5,01 *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* e 5,00 *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)*, no entanto semelhante à população bacteriana observada em planta suscetível resistente à bactéria (Williams 82, Figura 17B).

Na Figura 18C podem ser observadas as populações bacterianas obtidas em cada tempo amostrado na curva em *N. benthamiana*, para os clones *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* e *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)* crescidos em meio de cultura somente com rifampicina e em meio com rifampicina e gentamicina. Não houve diferença significativa pelo teste t a 5% na quantificação do número de UFCs obtidas a partir de *N. benthamiana* nos dois meios seletivos avaliados para o clone *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)*. No entanto para o clone *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* houve diferença significativa a partir do segundo dia, resultando em maior número de colônias recuperadas no meio sem gentamicina (ausência de seleção para o vetor), indicando possível instabilidade do plasmídeo. Entretanto, assim como na curva de crescimento no genótipo PI 587905, na PCR das colônias recuperadas a partir de placas com meio de cultura só com rifampicina, e de placas com rifampicina e gentamicina, realizada com primers específicos para os respectivos genes candidatos dos clones *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* e *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)*, houve amplificação das colônias de todos os clones inoculados e de todos os dias coletados.

Em relação à curva de crescimento em tabaco (Figura 18B), considerando a curva de crescimento como um todo (população bacteriana inicial – população bacteriana final) e o crescimento ao longo dos dias para cada intervalo, não houve diferença significativa entre o controle (*Psg 1462* não transformada) e os clones *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP)* infiltrados, e nem entre *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_71)* e *Psg1462(pEDV6::PHPA_RSP_23)*. Nota-se que o crescimento bacteriano foi praticamente estável em tabaco durante o período avaliado e

que este foi mínimo, variando em torno de $1 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/cm}^2$, diferentemente do crescimento ascendente observado em *N. benthamiana*. Enquanto em *N. benthamiana* foram observados $\text{Log}_{10} \text{ ufc/cm}^2$ de 5 a 6 no 3º dia, em tabaco, neste mesmo dia de amostragem, os $\text{Log}_{10} \text{ ufc/cm}^2$ variaram de 1 a 2.

4.4 Inoculação a vácuo de clones de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 no genótipo Williams 82 para visualização de HR

Foram observados sintomas iniciais de HR nas plantas inoculadas com o controle positivo (*Psg* 1462 não transformada) a partir de 48 horas após a inoculação, no entanto nas plantas inoculadas com o clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71), sintomas parecidos só puderam ser visualizados a partir do 5ª dai. Em plantas inoculadas com *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) não foram observados sintomas nítidos. A HR foi mais definida nas plantas inoculadas com *Psg* 1462 não transformada (controle), apesar de ter sido fraca e observada principalmente nas folhas cotiledonares e em alguns folíolos do 1º trifólio expandido. Na Figura 19 podem ser observados os sintomas após a inoculação na $\text{OD}_{600} = 0,1$ com o controle positivo (*Psg* 1462 não transformada) (Figuras 19B e 19F) e os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) (Figuras 19C e 19G) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) (Figura 19D e 19H), comparativamente ao controle negativo (Figuras 19A e 19E) aos 5 dai. Nas plantas inoculadas com o controle negativo (10 mM MgCl_2 +Silwet L-77), e também nas demais plantas inoculadas, foram observadas lesões idênticas as já relatadas nas infiltrações a vácuo anteriormente realizadas nos genótipos PI 587905, PI 594538-A e Williams 82 (Figura 15).

A contagem das UFCs após a coleta dos discos foliares imediatamente após a inoculação revelou que para o controle positivo (*Psg* 1462 não transformada) haviam sido efetivamente inoculadas $1,1 \times 10^6 \text{ ufc/mL}$, enquanto para *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) foram inoculadas $5 \times 10^5 \text{ ufc/mL}$ e para *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) $4,8 \times 10^5 \text{ ufc/mL}$. Esta variabilidade pode explicar as diferenças na capacidade de indução de HR e sintomas observados.

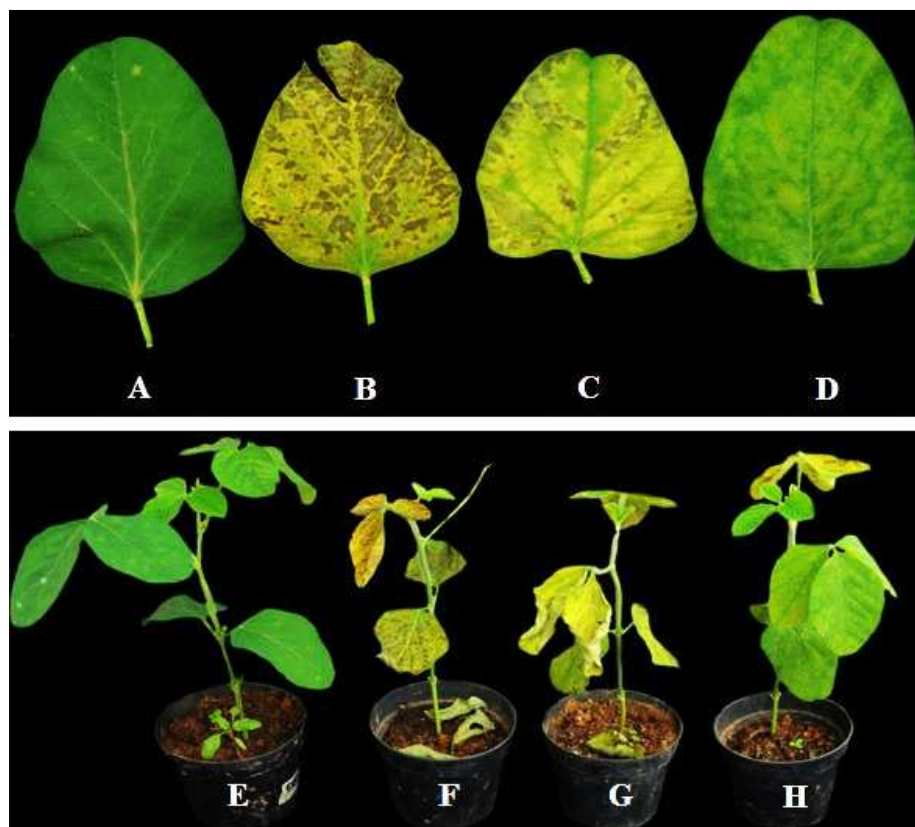


Figura 19 – Sintomas observados em Williams 82 após inoculação a vácuo com *Psg* 1462 não transformada, os clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23), em comparação à inoculação com solução salina. (A) e (E) solução salina (controle negativo): 10 mM MgCl₂+Silwet L-77; (B) e (F) controle positivo: *Psg* 1462 não transformada; (C) e (G) *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71); (D) e (H) *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23). As plantas foram infiltradas com suspensões bacterianas a OD₆₀₀ = 0,1. Fotos tiradas 5 dai.

5. DISCUSSÃO

A inoculação por mergulho não se mostrou um método consistente para análise funcional de genes candidatos de *P. pachyrhizi* baseado no SST3 de *Psg* 1462, uma vez que de forma geral não houve uma boa uniformidade na severidade apresentada entre os experimentos realizados durante a análise funcional. Esta variabilidade pode ser explicada tanto pela influência da época de realização do experimento no crescimento das plantas, que afetou o padrão de desenvolvimento dos tecidos e sua maturidade, consequentemente os resultados (apesar de se buscar a utilização de plantas no mesmo estágio fenológico), bem como pela utilização de uma suspensão bacteriana com número de ufc/mL desigual entre os experimentos (apesar de todas as suspensões bacterianas terem sido previamente ajustadas para a $OD_{600} = 0,5$), já que não houve uma coleta de tecido foliar após a inoculação dos clones para aferir a população bacteriana na folha logo após a inoculação, e isto pode ter influenciado na manifestação da severidade nos genótipos entre os experimentos realizados.

A variabilidade na severidade observada entre as repetições biológicas (mesmo genótipo, mesma época de inoculação), para os clones contendo efetores e para o controle, poderia ser explicada pela variabilidade no vigor das sementes de um mesmo genótipo, apesar de as plantas terem sido conduzidas sob as mesmas condições e inoculadas concomitantemente. Essa variabilidade intrínseca ao próprio genótipo pode também explicar a maior ou menor sensibilidade de plantas à combinação do método de inoculação (a vácuo) com a presença de Silwet L-77, uma vez que a inoculação a vácuo promove uma infiltração forçada da suspensão bacteriana sendo, portanto, um método mais drástico, podendo causar danos e fitotoxicidade (no caso do Silwet L-77) nos tecidos mais tenros. Apesar disso, nos ensaios para determinação das curvas de crescimento, observou-se uma maior uniformidade na severidade de sintomas entre as repetições biológicas, comparativamente ao método de inoculação por mergulho usado na triagem inicial dos genes candidatos.

Apesar da variabilidade da severidade dos sintomas observada nos diferentes ensaios, foi possível selecionar dois genes candidatos para estudos funcionais mais detalhados. A avaliação da severidade dos sintomas no genótipo PI 594538-A causados pelo clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) comparativamente a *Psg* 1462 não transformada, indicou uma possível atividade supressora de resposta de defesa do efector PHPA_RSP_71 neste genótipo. A supressão de resposta de defesa, como inicialmente sugere o fenótipo desta interação, poderia ser traduzida por um maior crescimento bacteriano neste genótipo. No

entanto, ao se analisar o crescimento bacteriano no genótipo PI 594538-A, o clone *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) apresentou menor crescimento em comparação ao controle (*Psg 1462* não transformada) e ao clone *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23). No entanto em tabaco, em *N. benthamiana* e nos genótipos de soja PI 587905 e Williams 82, *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71) não apresentou crescimento diferente dos demais clones analisados. O fato de não ter ocorrido diferença significativa nas demais quantificações bacterianas *in planta*, sugere que pEDV6::PHPA_RSP_71 não trouxe efeitos deletérios para a fisiologia de *Psg 1462*, pois a bactéria expressando o efector apresentou o mesmo comportamento da bactéria não transformada em planta não hospedeira (ex. tabaco) e em soja resistente e suscetível à bactéria, respectivamente (Williams 82 e PI 587905). Desta forma, com base nesses resultados pode-se concluir que a maior severidade de sintomas observada no genótipo PI 594538-A em resposta à inoculação com o clone *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_71), pode ter sido causada pela utilização de uma suspensão bacteriana com um maior número de ufc/mL (apesar de todas as suspensões bacterianas terem sido previamente ajustadas para a OD₆₀₀ = 0,5), já que não houve uma coleta de tecido foliar após a inoculação dos clones, para aferir a população bacteriana na folha logo após a inoculação.

Abe (2012) ao também fazer uma análise funcional nos mesmos genótipos pelo sistema EDV, no entanto utilizando pEDV6::PHPA_RSP_71 em *Psg* raça 4 e avaliando o fenótipo após inoculação à vácuo, observou menor evolução dos sintomas com esse clone em todos os genótipos avaliados, o que poderia indicar uma possível ativação de respostas de defesa ou até mesmo uma interferência deste efector no SST3. Resultados opostos foram observados no presente estudo, uma vez que por meio da inoculação por mergulho nos mesmos genótipos, no entanto utilizando o isolado bacteriano *Psg 1462*, observou-se para pEDV6::PHPA_RSP_71 maior severidade. Resultado similar ao observado por Abe (2012) para este clone foi observado somente na interação com o genótipo PI 594754, em que houve menor severidade em relação ao controle, sugerindo uma ativação de respostas de defesa neste genótipo. Todavia, essa interação tem que ser também confirmada futuramente pela análise de crescimento bacteriano.

O clone *Psg1462*(pEDV6::PHPA_RSP_23) apresentou a menor severidade de sintomas em todos os genótipos de soja e entre todos os clones bacterianos inoculados. Esse resultado sugeriu uma possível interferência do efector PHPA_RSP_23 na funcionalidade do SST3 de *Psg 1462*, o que poderia resultar num menor crescimento dessa bactéria tanto em

plantas hospedeiras quanto em plantas não hospedeiras. Essa hipótese foi inicialmente reforçada pela atenuação dos sintomas de HR observados em tabaco, uma vez que mutações nos genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) juntamente com os genes *hrc* (*hrp conserved*) que codificam o SST3, resultam na atenuação ou perda da capacidade de indução de HR em plantas não hospedeiras e de patogenicidade em plantas hospedeiras, não permitindo ou reduzindo a manifestação de sintomas em cultivares suscetíveis (Tampakaki *et al.*, 2010). Todavia, o crescimento desse clone não foi diferente de *Psg* 1462 não transformada e dos outros clones inoculados nos genótipos de soja avaliados. Da mesma forma, não se observou diferenças entre o crescimento do clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) e *Psg*1462 em tabaco ou em *N. benthamiana*.

Fabro *et al.* (2011) em um estudo de análise funcional de candidatos a efetores de *H. arabidopsidis* em diferentes genótipos de *Arabidopsis* também utilizando o sistema EDV, observaram que a maioria dos efetores contribuiu para o crescimento bacteriano de maneira geral nos genótipos avaliados de *Arabidopsis*, o que sugere que os efetores analisados são capazes de suprimir as respostas de defesa, evitando o reconhecimento pelo hospedeiro. No entanto devido à falta de especificidade entre o fenótipo observado e os diversos efetores avaliados, os autores postularam que os efetores de *H. arabidopsidis* poderiam estar interferindo com a função dos próprios efetores da espécie bacteriana utilizada. De modo análogo, é possível que ao afetar o SST3, PHPA_RSP_23 pode afetar não só sua própria translocação mas também a translocação dos efetores de *Psg* 1462, restringindo a severidade dos sintomas e também a secreção de efetores envolvidos na ativação da HR em plantas não hospedeiras. Desse modo, para melhor elucidar os resultados encontrados (atividade supressora de morte celular em tabaco, supressão de respostas de defesa em *N. benthamiana* e no genótipo Williams 82 e ativação de respostas de defesa nos demais genótipos de soja), é necessária uma análise de secreção *in vitro* e *in planta* da proteína codificada por PHPA_RSP_23 para verificar a funcionalidade do SST3 e assim comprovar que os resultados observados em soja e tabaco são devido à atividade da proteína efetora codificada por PHPA_RSP_23.

De forma geral, as diferenças observadas entre os diferentes genótipos de soja quanto à inoculação dos clones bacterianos de *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP) por mergulho, podem ser devido à própria variabilidade genética entre os genótipos de soja. Em seus estudos Fabro *et al.* (2011) sugerem que a agressividade de *H. arabidopsidis* aos diferentes genótipos de *Arabidopsis* testados pode ser o resultado da atuação de diversos efetores que apresentam

efeitos genótipo-específicos fracos. Desse modo alguns alvos dos efetores seriam conservados entre os genótipos, já outros alvos seriam variáveis.

É clara a influência na obtenção dos resultados, do método de inoculação e da estirpe/isolado de *Psg* utilizado, uma vez que estirpes/isolados diferentes da mesma espécie bacteriana apresentam efetores diferentes, que podem interagir de forma diversa com os efetores de *P. pachyrhizi* expressos, uma vez que no trabalho de Abe (2012) utilizando *Psg4*(pEDV6::PHPA_RSP) e os mesmos genótipos, os genótipos mais suscetíveis de forma geral, foram PI 594754, PI 587880-A e PI 594835-A, enquanto no presente estudo foram os genótipos PI 587886 e PI 587905, sendo que o genótipo PI 594754 anteriormente apontado entre os mais suscetíveis, neste estudo figura no grupo dos mais resistentes. Portanto sugere-se que se busque uma melhor padronização para a obtenção de novos resultados.

Ashfield *et al.* (1995) analisando o crescimento bacteriano de *Psg* raça 4 em cultivares de soja contendo o gene RPG1 que reconhece tanto *avrB* quanto *avrRpm1*, obtiveram nas interações compatíveis (para ufc/mL semelhantes às utilizadas neste trabalho) populações bacterianas (Log_{10} ufc/cm²) entre 6 e 7 já no 2º dai e para as interações incompatíveis, entre 4 e 5. Katagiri *et al.* (2002), estudando a interação entre *P. syringae* e *Arabidopsis* também observaram populações bacterianas de aproximadamente 7 já no 2º dai para interação compatível (para ufc/mL semelhantes), com queda populacional já no 4º dai; e para interação incompatível também observaram populações bacterianas entre 4 e 5 com crescimento estável a partir do 2º dai. No entanto no presente estudo, populações bacterianas semelhantes foram obtidas mais tardiamente nas interações compatíveis (genótipos PI 587905 e PI 594538-A), sendo que até o 8º dai não foi observada queda populacional, revelando que *Psg* 1462 cresce mais lentamente e que, portanto, a queda populacional também ocorre mais tardiamente. Nos genótipos PI 587905 e PI 594538-A, o aparecimento dos sintomas a partir do 4º dia, está de acordo com o que foi relatado por Katagiri *et al.* (2002) na interação de *P. syringae* e *Arabidopsis*, uma vez que os autores também correlacionaram o aparecimento dos sintomas iniciais no 2º dai, ao pico populacional de crescimento bacteriano (Log_{10} ufc/cm² = ~7), que no presente estudo ocorreu justamente por volta do 4º dai.

Na curva de crescimento no genótipo Williams 82 (interação incompatível), foram obtidas populações bacterianas mais elevadas (cerca de 1 Log_{10} a mais) do que as observadas por Ashfield *et al.* (1995) e Katagiri *et al.* (2002) para para ufc/mL semelhantes às inoculadas neste trabalho. Porém, uma vez que houve uma tendência à estabilização do crescimento já a partir do 2º dia (bem como observado nos referidos estudos) tendência esta que permaneceu

até o 6º dia (e que difere do comportamento observado nos genótipos suscetíveis à *Psg* 1462), a curva obtida no genótipo Williams 82 é condizente com uma curva de crescimento para uma interação incompatível, o que comprova que de fato este genótipo tem resistência à *Psg* 1462. Provavelmente o fato de a bactéria ter crescido um pouco mais do que o convencional, se relaciona com o próprio resultado de HR fraca observado na inoculação a vácuo na $OD_{600} = 0,1$ 48 horas após a inoculação com o controle (*Psg* 1462 não transformada). Portanto estes resultados a priori, confirmam que de fato o genótipo Williams 82 pode ser utilizado como controle negativo para doença (controle positivo para resistência), uma vez também que a estirpe de *Psg* 1462 não transformada (controle positivo para doença), não é capaz de provocar sintomas neste genótipo. Abe (2012) ao inocular a vácuo este genótipo com a construção pVSP61-avrB em diferentes concentrações, visualizou HR nítida 48 horas após a inoculação, uma vez que este genótipo tem o gene RPG1 que reconhece a proteína de avirulência avrB produzida por *Psg* (Zou *et al.*, 2005).

O crescimento bacteriano observado em tabaco foi consistente com crescimento observado em espécies não hospedeiras (para ufc/mL semelhantes), uma vez que não houve praticamente nenhum crescimento bacteriano, pois o quantitativo inoculado se manteve constante ao longo do período amostrado, sendo que a população bacteriana máxima obtida (Log_{10} ufc/cm²) foi de aproximadamente 3, que é consistente com a população bacteriana máxima obtida por exemplo por Sharma *et al.* (2013) para *B. glumae* em *N. benthamiana* (espécie não hospedeira) e por Katagiri *et al.* (2002) para *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrpH* (mutante no SST3, portanto não patogênica) em *Arabidopsis*.

Em *N. benthamiana*, foi observada uma tendência de elevado crescimento bacteriano para uma espécie não hospedeira (para ufc/mL semelhantes na literatura), uma vez que ao 3º dai foi obtida população bacteriana próxima de 6 (Log_{10} ufc/cm²) com tendência de continuidade do crescimento, o que contraria o comumente observado em plantas não hospedeiras, como o observado por Sharma *et al.* (2013) para *B. glumae* em *N. benthamiana*, em que a população bacteriana máxima obtida foi em torno de 3 havendo queda populacional já ao 3º dai. Wei *et al.* (2007) mutaram quatro grupos de genes que codificam 13 efetores de *Pst* DC3000 que possuem capacidade para provocar HR em *N. benthamiana*, entre eles o *cluster* IV (*hopD1*, *hopQ1-1*, *hopR1*) que codifica o efector HopQ1-1. Mutações no *cluster* IV e apenas no efector *hopQ1-1*, permitiram que os mutantes se multiplicassem a níveis elevados, produzissem sintomas e extensa necrose em *N. benthamiana* semelhantemente ao que foi observado na patogênese por *P. syringae* pv. *tabaci* (*Pta*). Esses resultados indicam que *Pst*

DC3000 é capaz de causar doença em *N. benthamiana* caso haja uma mutação no efector *hopQ1-1* ou no *cluster IV* e que o caráter dos sintomas observados é alterado pela presença dos efetores restantes, sugerindo que o efector HopQ1-1 pode atuar como determinante de virulência na interação entre *Pta* e *N. benthamiana*, e já para a interação com *Pst* DC3000, ele seria o único determinante de avirulência, impedindo *Pst* DC3000 de causar doença. Portanto é possível que *Psg* 1462 seja capaz de causar doença em *N. benthamiana* por não possuir efetores reconhecidos pelo sistema de defesa dessa planta. Alternativamente, *Psg* 1462 pode ter efetores que suprimem o sistema de defesa de *N. benthamiana* e que não estão presentes em outros isolados desta bactéria. Portanto a necrose observada nas infiltrações para HR poderia não se configurar como HR, e sim como parte dos sintomas da doença, semelhantemente à necrose provocada por *Pta* quando infiltrada na mesma concentração (1×10^8 ufc/mL) em folhas de *N. benthamiana*, conforme observaram Wei *et al.* (2007). Para confirmar esta hipótese e comprovar que *Psg* 1462 apresenta ausência de efetores que são reconhecidos pelo sistema de defesa da planta ou presença de efetores que suprimem respostas de defesa, diferentemente a outros isolados/estirpes de *Psg*, estudos mais detalhados na mesma linha dos realizados por Wei *et al.* (2007) são necessários, utilizando *Psg* 1462 e outros isolados e estirpes, como por exemplo, *Psg* raça 4.

Por fim, em relação aos clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23) crescidos em meio de cultura somente com rifampicina e em meio com rifampicina e gentamicina na curva de crescimento em soja (PI 587905) e em *N. benthamiana*, o fato de não ter sido observada de forma geral, diferença significativa pelo teste t a 5% na quantificação bacteriana/crescimento *in planta* entre os meios seletivos avaliados, comprova a estabilidade do vetor pEDV6 na bactéria na ausência de seleção *in vitro* e durante a interação com a planta; com exceção da quantificação bacteriana do clone *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) em *N. benthamiana*, em que a partir do segundo dia avaliado há uma tendência de instabilidade do plasmídeo, uma vez que foi recuperada maior população bacteriana no meio seletivo sem seleção *in vitro*. A amplificação por PCR dos genes candidatos dos clones *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_71) e *Psg*1462(pEDV6::PHPA_RSP_23), recuperados a partir de colônias crescidas com os dois meios seletivos, comprova que de fato, as colônias recuperadas em ambos os meios continham os clones de interesse inicialmente inoculados. No entanto para provar que os efetores são de fato translocados para o citoplasma das cultivares de soja resistentes, são necessários estudos de secreção, *in vitro* (cultivar esses clones em meio mínimo e extrair as

proteínas) e também de translocação *in vivo* extraindo as proteínas do tecido vegetal inoculado.

6. CONCLUSÕES

- i. A análise funcional de 10 genes de *Phakopsora pachyrhizi* que codificam proteínas secretadas utilizando o vetor EDV e o SST3 de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462, pelo método de mergulho, permitiu a seleção inicial de dois efetores para estudos funcionais detalhados: 1) PHPA_RSP_71 pelo fato da sua expressão em *Psg* 1462 resultar em maior severidade de doença no genótipo PI 594538-A e menor severidade no genótipo PI 594754; e 2) PHPA::RSP_23 cuja expressão resultou em redução da severidade dos sintomas nos diversos genótipos avaliados e na atenuação da HR em tabaco.
- ii. A análise temporal do crescimento bacteriano nos genótipos de soja não confirmou a atividade efetora postulada para PHPA_RSP_71 e PHPA_RSP_23.
- iii. O método de inoculação por mergulho não se mostrou adequado para as análises funcionais em soja devido à alta variabilidade na severidade dos sintomas observados entre as repetições biológicas dos genótipos inoculados, em contrapartida à maior uniformidade na severidade observada nas inoculações a vácuo para as curvas de crescimento, sendo possivelmente o método de inoculação a vácuo mais indicado para estas análises.
- iv. O genótipo Williams 82 se mostrou resistente à *Psg* 1462, podendo ser utilizado como controle negativo para doença nas análises funcionais.
- v. *Psg* 1462 foi capaz de se multiplicar em níveis elevados em *N. benthamiana* que é comumente classificada como planta não hospedeira, não sendo possível determinar essa espécie como sendo adequada para estudos funcionais de indução/supressão de HR, ao se utilizar *Psg* 1462.
- vi. A expressão transiente de proteínas efetoras candidatas no citoplasma de variedades de soja resistentes a PPUFV02, através do SST3 de *P. savastanoi* pv. *glycinea* 1462 é uma técnica promissora, sendo que o vetor pEDV6 apresenta de forma geral estabilidade e não altera a capacidade de multiplicação da bactéria *in planta*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, V.Y. **Expressão transiente de genes de *Phakopsora Pachyrhizi* em genótipos resistentes de soja visando a identificação de genes de avirulência.** 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

Alfano, J.R.; Collmer, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.385-414, 2004.

Andrade, P.J.M.; Andrade, D.F.A.A. **Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Chapadão do Sul: Fundação Chapadão, 2002. 11p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 11).

APROSOJA BRASIL, Associação dos Produtores de Soja do Brasil, 2014. Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/a-historia-da-soja/>> Acesso em: jun. 2014.

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.

Badel, J.L.; Piquerez, S.J.M.; Greenshields, D.; Rallapalli, G.; Fabro, G.; Ishaque, N.; Jones, J.D.G. *In planta* effector competition assays detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* effectors that contribute to virulence and localize to different plant subcellular compartments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.26, n.07, p.745-757, 2013.

Budde, I.P.; Ullrich, M.S. Interactions of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* with host and nonhost plants in relation to temperature and phytotoxin synthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.9, p.951–961, 2000.

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

Bromfield, K.R. Soybean rust. Monograph (American Phytopathological Society), **American Phytopathological Society**, n.11, 1984. 65p.

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

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

Catanzariti, A.M.; Dodds, P.N.; Ellis, J.G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v.269, n.02, p.181-188, 2007.

Chatterjee, S.; Chaudhury, S.; McShan, A.C., Kaur, K.; De Guzman, R.N. Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. **Biochemistry**, v.52, n.15, p.2508–2517, 2013.

Cheng, Y.W.; Chan, K.L. The breeding of rust resistant soybean Tainung 3. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v.17, p.30-34, 1968.

CNA, Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/ferrugem-asiatica-ja-causou-prejuizos-de-us-25-bilhoes-na-lavoura-de-soja>> Acesso em: jun. 2014.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. v.1 – Safra 2013/14, n.9 - Nono levantamento, Brasília, p. 1-80, jun.14.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_06_10_12_12_37_boletim_graos_junho_2014.pdf> Acesso em: jun. 2014.

Consórcio Antiferrugem, 2014. Disponível em: <<http://www.consorcioantiferrugem.net/portal/>> Acesso em: jun. 2014.

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

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

de Jonge, R.; Bolton, M.D.; Thomma, B.P.H.J. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p. 400-406, 2011.

de Wit, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, n. 21, p. 2726- 2732, 2007.

Dixon, D.A.; Harrison, M.J.; Lamb, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.479-501, 1994.

Dodds, P.N.; Lawrence, G.J.; Catanzariti, A.M.; Ayliffe, M.A.; Ellis, J.G. The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. **Plant Cell**, v.16, p.755-768, 2004.

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, n. 04, p.993-999, 2009.

Du, J.; Rietman, H.; Vleeshouwers, V.G.A.A. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Visualized Experiments**, v.83, p.1-7, 2014. Video Article. Disponível em: < <http://www.jove.com/video/50971>> Acesso em: jun. 2014.

EMBRAPA SOJA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2014. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16> Acesso em: jun. 2014.

Fabro, G.; Steinbrenner, J.; Coates, M.; Ishaque, N.; Baxter, L.; Studholme, D.J.; Körner, E.; Allen, R.L.; Piquerez, S.J.M.; Rougon-Cardoso, A.; Greenshields, D.; Lei, R.; Badel, J.L.; Caillaud, M.C.; Sohn, K.H.; Ackerveken, G.V.; Parker, J.E.; Beynon, J.; Jones, J.D.G. Multiple candidate effectors from the Oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. **PLoS Pathogens**, v.07, n.11, p.1-18, 2011.

FIESP, Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, 2013. Disponível em: < <http://www.fiesp.com.br/publicacoes-agronegocio/tendencias-do-agronegocio-em-2023/>> Acesso em: jun. 2014.

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

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, 2013. **Protocol of the discussions and recommendations of the SBI working group of the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC)**. Frankfurt: Sterol Biosynthesis Inhibitor (SBI) Working Group, 2013. 10p. (Annual Meeting 2013). Disponível em: <<http://www.frac.info/work/Minutes%20of%20the%202013%20Meeting%20Recommendations%20for%202014.pdf>> Acesso em: jun.2014.

FRAC BRASIL, Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas, 2014. Disponível em: <<http://frac-brasil.org.br/frac/secao.asp?i=9&c=76>> Acesso em: jun. 2014.

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.

GIMP® 2.8, The GNU Image Manipulation Program. Disponível em: <<http://www.gimp.org/downloads/>>

Godoy, C.V.; Utiamada, C.M.; Meyer, M.C.; Campos, H.D.; Roese, A.D.; Forcelini, C.A.; Pimenta, C.B.; Filho, D.S.J.; Borges, E.P.; Siqueri, F.V.; Juliatti, F.C.; Henning, F.A.; Feksa, H.R.; Junior, J.N.; Costamilan, L.M.; Carneiro, L.C.; da Silva, L.H.C.P.; Sato, L.N.; Canteri, M.G.; Madalosso, M.; Ito, M.F.; Barros, R.; Balardin, R.S.; da Silva, S.A.; Furlan, S.H.; Montecelli, T.D.N.; Carlin, V.J.; Barros, V.L.P.; Venancio, W.S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 8p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 93).

Godoy, C.V.; Utiamada, C.M.; Meyer, M.C.; Campos, H.D.; Roese, A.D.; Forcelini, C.A.; Pimenta, C.B.; Filho, D.S.J.; Borges, E.P.; Siqueri, F.V.; Juliatti, F.C.; Feksa, H.R.; Grigolli, J.F.J.; Junior, J.N.; Carneiro, L.C.; da Silva, L.H.C.P.; Sato, L.N.; Canteri, M.G.; Madalosso, M.; Ito, M.F.; Martins, M.C.; Balardin, R.S.; Furlan, S.H.; Montecelli, T.D.N.; Carlin, V.J.; Barros, V.L.N.P.; Venancio, W.S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 7p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 99).

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.

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

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

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.

Hogenhout, S.A.; Van Der Hoorn, R.A.; Terauchi, R. Kamoun, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, n.02, p.115-122, 2009.

Jones, J.D.; Dangl, J.L. The plant immune system. **Nature**, v.444, n.7117, p.323-329, 2006.

Katagiri, F.; Thilmonyb, R.; Heb, S.Y. The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* interaction. **The Arabidopsis Book**, Rockville, MD, USA: American Society of Plant Biologists, p.1-35, 2002.

Li, S.; Smith, J.R.; Ray, J.D.; Frederick, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v.125, p.133-142, 2012.

Lee, S.; Yang, D.S.; Uppalapati, S.R.; Sumner, L.W.; Mysore, K.S. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana*. **BioMed Central Plant Biology**, v.13, n.65, p.3-13, 2013.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em: jun. 2014.

Maia, T.A. **Identificação e análise funcional de efetores de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro.** 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

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.

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.

Mycobank, International Mycological Association, 2014. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=134256&Fields=All>> Acesso em: jun. 2014.

Nomura, K.; Melotto, M.; He, S.Y. Supression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.361-368, 2005.

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

Paul, C.; Hill, C.B. Comparisons of visual rust assessments and DNA levels of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean genotypes varying in rust resistance. **Plant Disease**, v.95, n.08, p.1007-1012, 2011.

Pandey, A.K.; Yang, C.; Zhang, C.; Graham, M.A.; Horstman, H.D.; Lee, Y.; Zabolina, O. A.; Hill, J.H.; Pedley, K.F.; Whitham, S.A. Functional analysis of the asian soybean rust resistance pathway mediated by *Rpp2*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.24, n.02, p.194-206, 2011.

Petre, B.; Kamoun, S. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? **PloS Biology**, v.12, n.2, p.1-7, 2014.

Ray, J.D.; Morel, W.; Smith, J.R.; Frederick, R.D.; Miles, M.R. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. **Theoretical and Applied Genetics**, v.119, n.2, p.271-280, 2009.

Rytter, J.L.; Dowler, W.M.; Bromfield, K.R. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi*, causal agent of soybean rust. **Plant Disease**, v.68, p.818-819, 1984.

Skamnoti, P.; Ridout, C.J. Microbial avirulence determinants: guided missiles or antigenic flak. **Molecular Plant Pathology**, v.6, p.551-559, 2005.

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*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.394-403, 2004.

Sharma, S.; Sharma, S.; Hirabuchi, A.; Yoshida, K.; Fujisaki, K.; Ito, A.; Uemura, A.; Terauchi, R.; Kamoun, S.; Sohn, K.H.; Jones, J.D.G.; Saitoh, H. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. **The Plant Journal**, v.74, p.701-712, 2013.

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, 2009.

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.

Takeuchi, K.; Taguchi, F.; Inagaki, Y.; Toyoda, K.; Shiraishi, T.; Ichinose, Y. Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.22, p 6658–6665, 2003.

Tampakaki, A.P.; Skandalis, N.; Gazi, A.D.; Bastaki, M.N.; Sarris, P.F.; Charova, S.N.; Kokkinidis, M.; Panopoulos, N.J. Playing the “Harp”: evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. **Annual Review Phytopathology**, v.48, p. 347-370, 2010.

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, n.5, p.919-928, 2009.

TMG, Tropical Melhoramento e Genética, 2014. Disponível em: <<http://www.tmg.agr.br/>> Acesso em: jun. 2014.

Vale, F.R.X.; Fernandes Filho, E.; Liberato, J.R.; Zambolim, L. Quant – a software to quantify plant disease severity. **Proceedings of the 8th International Workshop on Plant Disease Epidemiology**. Ouro Preto, 1: 160, 2001.

Vleeshouwers, V.G.A.A.; Rietman, H.; Krenek, P.; Champouret, N.; Young, C.; Oh, S.K.; Kamoun, S.; Van Der Vossen, E.A.G. Effectors genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. **PloS ONE**, v.3; n.08, p.1-10, 2008.

Webb, C.A.; Fellers, J.P. Cereal rust fungi genomics and the pursuit of virulence and avirulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, n.1: p.1-7, 2006.

Wei, C.F.; Kvitko, B.H.; Shimizu, R.; Crabill, E.; Alfano, J.R.; Lin, N.C.; Martin, G.B.; Huang, H.C.; Collm, A.A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. **The Plant Journal**, v.51, p.32-46, 2007.

Win, J.; Chaparro-Garcia, A.; Belhaj, K.; Saunders, D.G.; Yoshida, K.; Dong, S.; Schornack, S.; Robatzek, S.; Hogenhout, S.A.; Kamoun, S. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harb Symposia on Quantitative Biology**. 2012.

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

Yorinori, J.T.; Lazzarotto, J.J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27p. (Embrapa Soja. Documentos, 236).

Zaramela, L.S. **Caracterização do secretoma de *Phakopsora pachyrhizi* expresso durante a interação com a soja**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

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 down regulation of photosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, n.11, p.1161-1174, 2005.