VIVIANE AGUIAR ANDRADE

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS SIMILARES A GENES DE RESPOSTA DE DEFESA A PATÓGENOS EM SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Gradução em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

T
A553i
2005

Andrade, Viviane Aguiar, 1976-
Isolamento e caracterização de seqüências expressas similares a genes de resposta de defesa a patógenos em soja / Viviane Aguiar Andrade. – Viçosa: UFV, 2005.
xi, 68f : il. ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referência bibliográfica: f. 60-68.

1. Soja - Genética. 2. Soja - Resistência a doenças e pragas. 3. Soja - MelhoramentoGenético. 4. DNA complementar. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 583.3220487328

VIVIANE AGUIAR ANDRADE

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS SIMILARES A GENES DE RESPOSTA DE DEFESA A PATÓGENOS EM SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Gradução em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae.*

APROVADA: 29 de Julho de 2005

Profª. Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Profª. Tânia Maria Fernandes Salomão

Profª. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

Aos meus pais Dorinha (in memorian) e Fernando,
Aos meus irmãos Juninho e Carla,
Aos sobrinhos Caio, Ana Júlia e Luiz Fernando,
Ao Fabrício

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, luz maior de minha vida e responsável por todas as coisas.

A minha família pelo amor, confiança, carinho e apoio constantes, em especial à minha mãe que está sempre comigo e me fortalece para lutar por cada vitória. Ao meu pai e irmãos pelo apoio e incentivo incondicionais. Aos queridos sobrinhos que trazem luz e alegria à nossa família. Aos cunhados Regi e Luciene por completarem nossa família.

A Fabrício, presença mais que necessária, imprescindível em meus melhores e piores momentos, pelo amor e carinho, e principalmente pela paciência, preocupação, compreensão e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Á Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada á Agropecuária -BIOAGRO- pela infra-estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES- pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Dr. Everaldo Gonçalves de Barros pela orientação científica e pessoal; pela dedicação, amizade e confiança demonstradas durante todo o curso de mestrado.

À Professora e conselheira Elza Fernandes de Araújo, pela amizade, preocupação e interesse em minha formação acadêmica.

Ao Professor e conselheiro Maurílio Alves Moreira, pelo exemplo de amor e dedicação à pesquisa.

Aos Professores Luiz Orlando de Oliveira, Valéria Monteze Guimarães e Tânia Maria Fernandes Salomão por aceitarem participar da minha banca examinadora.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos compartilhados e pela preocupação com a minha formação acadêmica.

A Francismar Correia Marcelino pela amizade, paciência e dedicação, e pelos ensinamentos práticos de biologia molecular no início dos trabalhos.

A Beatriz de Almeida Barros, pela amizade e companheirismo; pelas dicas e sugestões para o desenvolvimento do trabalho, e pelas conversas descontraídas.

A Andréia Barcelos Passos de Lima pelas sugestões e discussões de resultados, pela amizade, e por demonstrar interesse e paciência em esclarecer minhas dúvidas.

Às amigas do laboratório de Sequenciamento e análise de Fragmentos de DNA: Ana, Pollyana, Cínthia, Cassiana, Mariana, Larissa, Josie, Maíra, Gizelle e Gisele, pelo ótimo ambiente de trabalho, e aos colegas e amigos dos Laboratórios de Genética Molecular de Plantas I e II.

A Denise e Fabiano, colegas do curso de Bioquímica Agrícola pelas horas de estudos e pelos momentos de descontração.

A Michellia e Andreza, companheiras de república, pela amizade, preocupação, companheirismo, união e convivência que proporcionaram momentos felizes e inesquecíveis. Valeu!!!

Aos novos amigos adquiridos durante o mestrado, companheiros inesquecíveis: Malu, Rodney, Dú, Luiz, Rodrigo, Gustavo, Thiago, Rui e tantos outros.

Aos amigos e familiares de Montes Claros que sempre torceram por mim e me incentivaram a buscar meus objetivos.

Aos tios Maria José e Cloves e primos Vitor, Igor, Laura e André por cuidar para que eu me sentisse em casa aqui em Viçosa.

Aos funcionários do BIOAGRO, Aloísio, Gláucea, Fausto, Marlene e Renata pela amizade e colaboração.

Ao Professor Patarroyo Salcedo e funcionários do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores pela disponibilização de equipamentos.

A Eduardo Monteiro, pela presteza, dedicação e bom humor constante na realização de seu trabalho e pela disposição e boa vontade em solucionar todos os problemas departamentais.

Aos funcionários da casa de vegetação, em especial ao Sr. Cupertino, pelo cuidado com os experimentos de campo, e ao Programa de Melhoramento da Soja pelo fornecimento das sementes e dos patógenos utilizados neste trabalho.

E a todos os amigos e pessoas, que de alguma maneira, contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Conteúdo

Página

RESUMO viii
ABSTRACT x
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. A Soja e Sua Importância Agroindustrial 4
2.2. A Planta e os Mecanismos de Resistência a Doenças 7
2.3. Genes de Resistência e Proteínas R 12
2.4. As Vias de Sinalização da Resposta de Defesa 15
2.5. Estratégias para o desenvolvimento da Genômica da Resistência 18
2.6. Caracterização da Sonda A53-09 20
3. MATERIAIS E MÉTODOS 23
3.1. Material vegetal 23
3.2. Patógeno 23
3.3. Inoculação do Patógeno e Coleta das Folhas para Extração do RNA 24
3.4. *Screening* da Biblioteca de cDNA 24
3.5. Obtenção e Marcação da Sonda 25
3.6. Hibridização 26
3.7. Excisão do Fagomídeo pBluescript do Vetor Uni-Zap XR 27
3.8. Extração DNA Plasmidial 28
3.9. Sequenciamento do DNA 28
3.10. Análise das Sequências 29
3.11. Extração de RNA Total 30
3.12. RT-PCR 31
3.12.1. Tratamento das Amostras de RNA Total com DNase 31
3.12.2. Síntese da Primeira Fita de cDNA 32
3.12.3 Reações de amplificação por PCR 32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4.1. Caracterização dos Clones Positivos 34
4.2. Alinhamento dos Clones Isolados com a Sonda A53-09 47
4.3. Análise da expressão do clone A5309-72 53

5. RESUMO E CONCLUSÕES 57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……..... 60

Resumo

Andrade, Viviane Aguiar, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005. **Isolamento e caracterização de sequências expressas similares a genes de resposta de defesa a patógenos em soja.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Maurílio Alves Moreira.

Devido à grande importância que a soja representa para a agricultura mundial, avanços vêm ocorrendo nas técnicas voltadas para o desenvolvimento genético, molecular e genômico desta leguminosa a fim de assegurar produção suficiente para a comercialização dos grãos e de seus derivados. As principais perdas no cultivo da soja são decorrentes de doenças. Entender as interações entre hospedeiro-patógeno e os mecanismos de resistência envolvidos nessa relação são importantes para possibilitar o controle de grandes epidemias em culturas agrícolas, bem como elucidar mecanismos de sinalização ativados em resposta ao patógeno. Dentro deste cenário, este trabalho objetivou a identificação de genes envolvidos na resposta de resistência a doenças da soja. Por meio do *screening* de uma biblioteca de cDNA do cultivar FT-Cristalina, clones positivos foram isolados utilizando o fragmento de RFLP A53-09 como sonda. Este fragmento possui 1019 pb e apresenta homologia a genes de resistência. Três clones foram obtidos a partir da análise de 5 x10^5 placas de lise de fagos recombinantes hibridizados à sonda, os quais foram denominados: A5309-47, A5309-71 e A5309-72. O tamanho estimado de cada um foi de 2,0; 1,3 e 1,12 kb, respectivamente. Estes clones foram seqüenciados e suas seqüências nucleotídicas foram submetidas à análise de similaridade com outras seqüências existentes no banco de dados *GenBank*, com o auxílio do programa BLASTX. O alinhamento entre as seqüências nucleotídicas dos clones isolados com a sonda A53-09 mostrou uma identidade de nucleotídeos variando entre 41 e 45%. O clone A5309-47 foi parcialmente seqüenciado, obtendo-se uma

sequência de 963 pb com uma ORF putativa correspondente a 78 resíduos de aminoácidos, homóloga à enzima lipoxigenase (LOX) de *Glycine max*, com 85% de identidade. O clone A5309-71 foi totalmente seqüenciado; contém 1587 pb com uma ORF correspondente a 306 resíduos de aminoácidos. A análise de similaridade revelou que há 75% de identidade deste clone com a proteína estearoil-acil dessaturase de *Arabidopsis thaliana*. O clone A5309-72 também foi totalmente seqüenciado, apresentando 1263 pb, com uma ORF correspondente a 124 resíduos de aminoácidos com identidade de 43% a uma peroxidase de *Glycine max*. Todos os clones isolados apresentaram similaridades com enzimas chaves para a ativação de várias vias de respostas de defesa, por meio de mecanismos que alteram todo o metabolismo da planta. Sendo assim, todas as seqüências de DNA obtidas correspondem a proteínas que estão potencialmente envolvidas na defesa da planta.

Abstract

Andrade, Viviane Aguiar, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005. **Isolation and characterization of expressed sequences similar to defense response genes to pathogens in soybean.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Committee Members: Elza Fernandes de Araújo and Maurílio Alves Moreira.

The great importance of soybean to world agriculture has brought advancements in techniques for the genetic, molecular and genomic development of this legume in order to assure enough production for the commercialization of grains and byproducts. The main losses in soybean crop are due to diseases. Understanding host-pathogen interactions and the resistance mechanisms involved in this relationship is important in making it possible to control major epidemics in crops, as well as to elucidate signaling mechanisms activated in response to pathogens. In this context, the objective of this work was to identify genes involved in the resistance response to soybean diseases. By screening a cDNA library of cultivar FT-Cristalina, positive clones were isolated using the A53-09 fragment as an RFLP probe. This 1019-pb fragment shows resistance gene homology. Three clones were obtained from the analysis of $5x10^5$ lysis plates of recombinant phages hybridized to the probe, which were named: A5309-47, A5309-71 and A5309-72. The estimated size of each one was of 2,0, 1.3, and 112 kb respectively. These clones were sequenced and their nucleotide sequences were analyzed for similarity to sequences in GenBank database, using the BLASTX software. The alignment between the nucleotide sequences of the clones isolated with the A53-09 probe showed a nucleotide identity varying between 41 and 45%. The clone A5309-47 was partially sequenced, resulting in a 963-pb sequence with a putative ORF corresponding to 78 amino acid residues, homologous to *Glycine max* lipoxigenase enzyme (LOX), with 85% identity. The clone A5309-71 was totally sequenced; it

contains 1587 pb with ORF corresponding to 306 amino acid residues. The similarity analysis revealed 75% identity of this clone with the protein estearoil-acyl desaturase of *Arabidopsis thaliana*. The clone A5309-72 was also totally sequenced, giving 1263 pb, with ORF corresponding to 124 amino acid residues with 43% identity to a *Glycine max* peroxidase. All isolated clones showed high similarities with key enzymes for the activation of several defense-response pathways, through mechanisms which modify the whole plant metabolism. Therefore, all DNA obtained sequences correspond to proteins potentially involved in plant defense.

1. Introdução

Com a expansão das áreas de cultivo de monoculturas, o número de doenças que afetam estas lavouras tem aumentado muito. Isto também ocorre com a soja (*Glycine max* L. Merrill) que é hoje uma das mais importantes espécies cultiváveis do mundo. Avaliações das perdas decorrentes de doenças têm mostrado que somente as doenças de final de ciclo, causadas por *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*, são capazes de reduzir o rendimento em mais de 20% na maioria das variedades (Arantes e Souza, 1993). A utilização de pesticidas pode promover uma proteção efetiva mas a sua aplicação pode ser comprometida pelos efeitos adversos sobre o meio ambiente e até pela emergência de linhagens de patógenos mais resistentes.

As plantas são capazes de resistir a ataques de patógenos por meio de mecanismos nos quais cada célula atacada percebe e responde ao ataque microbiano que está sofrendo. Esta defesa inicia-se com o reconhecimento do patógeno, é seguido pela ativação de mecanismos de defesa caracterizados pela resposta de hipersendibilidade (HR), reforço da parede celular e produção de compostos antimicrobianos no sítio de infecção, e culmina na resposta sistêmica adquirida (SAR).

A maioria das respostas de resistência são mediadas por genes específicos. Os chamados genes de resistência (*R*) são ativados em resposta à invasão de um patógeno, a qual induz a ativação rápida e localizada de mecanismos que promovem a proteção da planta contra o patógeno. A interação entre os produtos dos genes *R* e seus 35 correspondentes genes de avirulência (*Avr*) caracteriza o modelo de interação planta-patógeno proposto por Flor (Flor, 1971).

O sequenciamento de genes de resistência de plantas que já foram identificados mostra que a maioria deles apresenta motivos estruturais similares. Os produtos

codificados por estes genes geralmente possuem domínio com sítio de ligação a nucleotídeo (NBS), que ocorre em diversas proteínas com atividade dependente de ATP/GTP, ou domínio com repetição rica em leucina (LRR), que medeia a interação proteína-proteína (Sinapidou et al., 2004). Os genes *R* com domínios NBS ou LRR podem ser divididos em subclasses: uma que inclui os genes que codificam proteínas com o motivo *coiled coil* (CC) na região N-terminal, e outra que inclui genes cujas proteínas apresentam domínio TIR (receptor Toll de interleucina).

Outros genes também são requeridos para a resistência a doenças em plantas, entre eles aqueles que codificam proteínas cinases (MAP cinases, cinases dependente de Ca^{+2}), proteínas com atividade antimicrobiana, proteínas com funções constitutivas ou regulatórias (supressores e indutores), proteínas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na biossíntese de moléculas sinalizadoras. Esses genes são essenciais na defesa contra ampla gama de patógenos, provavelmente por atuarem em pontos basais das rotas de transdução de sinal (Buchanam et al., 2000).

Elucidar os mecanismos de resistência a doenças das plantas e da interação planta-patógeno possibilita o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças. O desenvolvimento destes cultivares é importante porque é um meio mais econômico e seguro de controlar as epidemias nas lavouras e garantir uma boa produção.

Visando a elucidação dos mecanismos de resposta ativados por meio destes genes, várias técnicas de biologia molecular têm contribuído para a descoberta de novos genes *R*, identificados e clonados em várias espécies de plantas incluindo soja, batata, alface, milho, feijão e *Arabidopsis* (Aarts et al., 1998).

Um método que apresenta grande potencial no isolamento de genes de resistência, de defesa e da via de transdução de sinal ativada durante a resposta ao ataque do patógeno é o *screening* de bibliotecas genômicas e de cDNA com sondas de DNA homólogas a genes de resistência.

Durante a construção de um mapa genético de ligação de uma população de soja obtida do cruzamento entre os progenitores *G. max* X *G. soja*, Rasfalski e Tingey (1993) utilizaram sondas de RFLP, obtidas de uma biblioteca genômica do cultivar de soja Bônus, que apresentavam baixo número de cópias. A análise da população revelou que 75% das bandas apresentadas eram monomórficas, enquanto que 0,5% das sondas que revelavam polimorfismo mapeavam em regiões altamente polimórficas ou hipervariáveis. Barros et al. (2000) sequenciaram cinco destas sondas. A análise das seqüências revelou que duas sondas não apresentavam similaridade a nenhuma

sequência do *GenBank*, enquanto as outras três seqüências apresentavam similaridade a genes de resistência a doenças de plantas.

Marcelino (2002) utilizou um fragmento de 295 pb contido na sonda de RFLP A53-09 identificada por Barros et al. (2000) para selecionar clones positivos similares a genes de resistência, a partir de uma biblioteca de cDNA construída de folhas no estádio V3 de desenvolvimento, da variedade de soja FT-Cristalina. Obteve como resultado, o isolamento e caracterização de quatro clones similares a genes potencialmente envolvidos na resposta de defesa a doenças em soja.

No presente trabalho, todo o fragmento de 1019 pb do clone A53-09 foi utilizado como sonda para a realização de um novo *screening* da biblioteca de cDNA de soja, construída por Marcelino (2002), com o objetivo de isolar e caracterizar clones com seqüências expressas similares a genes de resistência ou que estejam envolvidos no mecanismo de resposta de defesa contra fitopatógenos em soja.

2. Revisão de Literatura

2.1. A Soja e sua importância agroindustrial

A soja, [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma leguminosa herbácea pertencente ao gênero Glycine, com 2*n*=40, que apresenta uma grande variabilidade genética, e é considerada a fonte de proteína e óleo vegetal mais importante no mundo, para a nutrição humana e animal, devido a sua alta qualidade e seu baixo custo de produção (Godoy e Canteri, 2004). Segundo Fehr (1987), citado por Godoy e Canteri (2004), uma típica semente de soja acumula 40% de proteína e 20% de óleo, o que a torna uma das mais importantes dentre as leguminosas sob o ponto de vista econômico.

O genoma da soja é grande e compreende aproximadamente 1.115 Mb/valor C (Arumuganathan e Earle, 1991), sendo maior que o genoma da Arabidopsis (145 Mb) e do arroz (420 Mb). Singh e Hymowitz (1988) propuseram que 35% do genoma da soja seria constituído por heterocromatina, e Goldberg (1978), em estudos de renaturação do DNA, propôs que de 40-60% do genoma é de DNA repetitivo. Análises de BACs sugerem que embora algumas regiões sejam predominantemente ricas em genes ou ricas em repetições, muitos locos contém uma mistura de seqüências gênicas e seqüências repetitivas (Marek et al., 2001).

A variabilidade genética da soja pode ser observada em diversas características como: tamanho, forma e cor das sementes (Stacey et al., 2004), tipos de folhas e padrões de ramificação, sensibilidade ao fotoperíodo (Palmer et al., 2004). Além disso, há diferenças em vários genes que, além de caracteres morfológicos e reprodutivos, afetam a nodulação, a compatibilidade específica a diferentes gêneros de rizóbios, e

condições de resistência/suscetibilidade a vírus, nematóides, fungos e bactérias (Stacey et al., 2004).

A soja foi domesticada e cultivada inicialmente na China por centenas de anos (Xu et al., 1986), mas hoje é cultivada em todo o mundo. No Brasil, foi introduzida em 1908 por imigrantes japoneses nos estados da Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), entretanto, apenas a partir da década de 70 observou-se o crescimento da sua produção no país. Desde 1970 a sojicultura tem se expandido da região onde se iniciou seu cultivo para outras áreas do país devido a fatores como: condições climáticas favoráveis, boa infra-estrutura (sistema viário, portuário, comunicações), o estabelecimento de uma articulada rede de pesquisa de soja e o surgimento de um cooperativismo dinâmico e eficiente (EMBRAPA, 2003).

A partir da década de 80, os estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul foram alcançados pelo cultivo da soja, dentro do movimento agropecuário em direção ao oeste brasileiro (Igreja et al., 1998). Atualmente, áreas da Amazônia Legal (região Norte, Mato Grosso e oeste do Maranhão) também estão sendo alvos do avanço do cultivo de soja (Mueller e Bustamante, 2002).

Os maiores produtores de soja (80% da produção mundial) são: Estados Unidos, Brasil, Argentina e China. Os três primeiros são responsáveis por 90% da comercialização mundial da oleaginosa, sendo o Brasil o segundo maior exportador, enquanto que a China consome sua produção internamente (Arantes e Souza, 1993).

A transformação industrial dos grãos de soja possibilita a obtenção do óleo, da torta (resíduo da trituração dos grãos) e de farinha, e a partir destes, produtos como: lectina de soja, óleo alimentício, margarina, gordura emulsionada, leite de soja, queijo de soja (tofu), molho de soja e as proteínas vegetais texturadas (PVT) que são bastante utilizadas em substituição à carne (Bertrand et al., 1987). Ultimamente, outros usos da soja têm sido revelados no campo da medicina (combate ao alcoolismo, tratamento de câncer de mama e próstata), e na produção de tintas, colas e protetores solares (Pinho, 2004).

Devido à grande importância que a soja representa para a agricultura mundial, avanços vêm ocorrendo nas técnicas voltadas para o desenvolvimento genético, molecular e genômico da soja (Stacey et al., 2004) a fim de assegurar produção suficiente para a comercialização do grão e de seus derivados. A aplicação de marcadores moleculares na detecção de variabilidade genética, tanto em estudos

genéticos como na prática do melhoramento vegetal é uma das pesquisas mais realizadas atualmente.

O mapa genético da soja está quase totalmente saturado por diferentes marcadores moleculares, incluindo SSRs (sequências repetidas únicas) e RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição) que intercalam randomicamente todo o genoma da soja (Stacey et al., 2004). A utilização destes marcadores auxilia na determinação do genoma da soja favorecendo a caracterização das coleções dos germoplasmas, ajudando a eliminar redundâncias e a identificar e preservar características importantes. Uma vez identificadas as características de maior importância para os programas de melhoramento, é possível o desenvolvimento de novas variedades que apresentem alta produção, com níveis desejados de óleo e proteína, com custos baixos.

O desenvolvimento de novas variedades adaptadas aos trópicos e a geração de novas tecnologias contribuiu para que o Brasil aumentasse sua produção, com valor estimado na safra 2003/2004 de 49.770 mil toneladas de grãos em 21.275 mil hectares plantados, apresentando uma produtividade de 2.339 kg/ha, embora o potencial do Brasil tenha sido estimado em 3.600 kg/ha (Conab, 2005). Dentre os vários fatores que contribuem para que o potencial produtivo da cultura não seja atingido estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, que atacam a cultura da soja, já foram identificadas no Brasil.

A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra (EMBRAPA, 2002). Para o Brasil, perdas com doenças representa um prejuízo anual de cerca de 20 milhões de dólares. Entre os anos de 1988 e 1990 houve uma perda de 9% na produção mundial de soja devido ao ataque de patógenos, o que equivale a uma cifra de 3,2 bilhões de dólares (http: //www.conabe.gov.br).

As principais perdas no cultivo da soja são decorrentes do cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis), da antracnose (*Colletotrichum dematium* var. truncata), da mancha parda (*Septoria glycines*), do crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), da mancha "olho-de-rã" (*C. sojina*), da seca da haste e da vagem (*Phomopsis sojae* e outras espécies), da podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*), dos nematóides de galhas (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*) e do nematóide do cisto (*Heterodera glycines*). Avaliações das perdas têm mostrado que somente as doenças de final de ciclo, causadas por *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*, são capazes de

reduzir o rendimento em mais de 20% na maioria das variedades (Arantes e Souza, 1993).

Dentre as diversas doenças que afetam as lavouras de soja, a cercosporiose, também conhecida como mancha "olho-de-rã", causada pelo fungo *Cercospora sojina* Hara é, provavelmente, a que tem causado maiores prejuízos a cultivares suscetíveis, reduzindo o rendimento e a qualidade das sementes (Cordeiro, 1992). Segundo Athow (1983), a doença foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos. No Brasil, foi descrita pela primeira vez por Yorinori (1971) no Paraná, e por Reis e Kimat (1973) no Rio Grande do Sul (Cordeiro, 1992).

Segundo Cordeiro (1992), as lesões nas folhas se apresentam como pequenas manchas angulares ou circulares, de coloração castanho-avermelhada, presentes somente na parte superior. Com o desenvolvimento da infecção, o centro torna-se cinza com uma estreita faixa castanho-escuro circundando a lesão. As plantas ficam inteiramente desfolhadas com os caules e vagens manchados de cinza a castanho.

O controle químico com fungicida, além de caro, não é o meio mais eficiente para controlar a mancha "olho-de-rã". O uso de cultivares resistentes a partir da incorporação de alelos de resistência em cultivares comerciais suscetíveis é o meio mais econômico e eficiente de controle, mas para isso, faz-se necessário conhecer o mecanismo de resistência das plantas (Gravina et al., 2004).

2.2. A planta e os mecanismos de resistência a doenças

As plantas são continuamente atacadas por bactérias, vírus, fungos, nematóides, mas elas geralmente dispõem de mecanismos para escapar desses patógenos e evitar que a doença se instale. Os mecanismos utilizados pelas plantas diferem do sistema de defesa dos animais que empregam células especializadas que são mobilizadas para o sítio de infecção onde imobilizam o microrganismo invasor e impedem que a infecção se espalhe. Nas plantas, as células não podem se mover, a resposta de defesa é autônoma, ou seja, cada célula pode perceber e responder a um ataque microbiano independentemente (Bonas e Lahaye, 2002).

As plantas, durante a sua evolução junto com os patógenos, desenvolveram mecanismos de resistência que podem ser constitutivos ou induzidos, assim, apesar da vasta gama de fitopatógenos, a resistência é regra e a suscetibilidade, exceção (Agrios, 1997).

Uma vez dentro das plantas estes patógenos utilizam três tipos de estratégias de colonização: necrotrófica, na qual as células das plantas morrem; biotrófica, a planta permanece viva; e hemibiotrófica, o patógeno mantém a célula viva inicialmente, mas em estádios avançados de infecção, mata as células (Buchanam et al., 2000).

A presença de barreira física (parede celular e cutícula); a produção de compostos fenólicos e alcalóides; a presença de metabólitos secundários (saponinas e glucosinolatos); o fato da planta não ser hospedeira (não apresentar os requerimentos básicos para sobrevivência do patógeno); ou apresentar sistema de reconhecimento do patógeno que induza uma ampla resposta de defesa são as principais razões para que um patógeno não tenha sucesso na sua infecção (Buchanan et al., 2000).

A doença só ocorre se uma infecção é bem sucedida, ou seja, quando a planta não é capaz de evitar que o patógeno a colonize, e é dito, neste caso, que a interação entre a planta e o patógeno é uma interação compatível, sendo a planta suscetível e o patógeno virulento. Mas se a planta não fica doente após a infecção por apresentar um eficiente mecanismo de reconhecimento capaz de deter o crescimento do patógeno, impedindo que a doença ocorra, esta planta é dita resistente, o patógeno é avirulento, e a interação planta-patógeno é dita incompatível (Nimchuk et al., 2003).

A resposta de resistência a patógenos é um sofisticado sistema de vigilância que é capaz de distinguir entre sinais próprios da planta e aqueles emitidos por patógenos, resultando na ativação de rápidas respostas de defesas conhecidas como resposta de hipersensibilidade (HR), que geralmente está associada à morte celular (Buchanan et al., 2000). Uma vez reconhecidos os sinais originados dos patógenos, o sistema de defesa das plantas ativa uma série de respostas de defesa, em processos coordenados tempo e espacialmente que levam à HR, que cria um ambiente desfavorável ao desenvolvimento do patógeno.

Análises genéticas revelam que esta proteção induzida é frequentemente determinada pela complementaridade dos pares de genes de resistência (*R*) da planta e genes de avirulência (*Avr*) dos microrganismos invasores (Bonas e Lahaye, 2002). A interação *R-Avr* baseia-se no modelo de interação gene-a-gene proposto pelo pesquisador de patologias de plantas Harold Flor (Loegering, 1987).

Esta interação tem sido confirmada na relação entre o tomate e o patógeno *Cladosporium fulvum*, na qual dois genes de avirulência, Avr_9 e Avr_4, codificam elicitores que induzem resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas de tomate que apresentam os genes de resistência CF_9 e CF_4 correspondentes (Joosten et al., 1997). Quando o patógeno não tem o gene *Avr* correspondente ele não é reconhecido pelo

hospedeiro e, portanto, não ocorre indução dos mecanismos de defesa, ou esta ocorre de um modo bastante lento, o que possibilita o crescimento do patógeno e o desenvolvimento da doença.

O modelo genético de interação gene-a-gene proposto por Flor tem inspirado a proposição de várias interpretações e diversos modelos bioquímicos alternativos para explicar a interação planta-patógeno. Bonas e Lahaye (2002) apresentam alguns modelos alternativos que tentam elucidar a maneira que ocorre a interação entre as plantas e os organismos que as atacam. Dentre estes modelos temos: 1) o modelo receptor-ligante no qual o ligante *Avr*, codificado pelo patógeno, se liga diretamente a uma proteína codificada pelo correspondente gene *R* da célula vegetal, iniciando o processo de defesa; 2) o modelo co-receptor no qual a proteína Avr se liga primeiro a um sítio de alta afinidade de um co-receptor que interage com a proteína R para induzir a resposta de defesa; 3) o modelo guarda, que segundo Lahaye (2004), é caracterizado pela formação de um complexo, no qual a proteína R serve de antena capaz de reconhecer a interação de fatores de avirulência ligados a alvos específicos da planta que conferem resistência; na ausência desta proteína antena a regulação da defesa fica comprometida e a infecção é bem sucedida; 4) e, por fim, o modelo que propõe que a elicitação da defesa seja dependente de proteases; ele sugere que várias proteínas Avr são potencialmente proteases que processam proteoliticamente as proteínas da planta iniciando a defesa.

Apesar de todos estes modelos terem sido propostos para explicar o mecanismo de interação planta-patógeno, Bonas e Lahaye (2004) afirmam que evidências moleculares em favor destes modelos ainda são escassas, sendo mais aceito o modelo de interação direta entre a proteína R e a proteína Avr, também conhecido como interação gene-a-gene.

Após o reconhecimento dos elicitores pela interação específica dos produtos dos genes *Avr* e *R*, a rápida indução da HR promove acumulação de compostos fenólicos, como fitoalexinas, e reforço da parede celular, o que evita ataques futuros por outros tipos de patógenos (Maarten et al., 2001). Estes compostos acumulados estão presentes em suas formas ativas ou armazenados como precursores inativos que são ativados por enzimas que respondem ao ataque do patógeno. Saponinas (compostos glicosilados) e glicosinolatos (compostos glicosilados que contém enxofre) são os principais metabólitos que atuam como enzimas destoxificantes ou compostos tóxicos para o patógeno (Buchanan et al., 2000). O reforço da parede celular é feito pela deposição de calose, lignina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e acúmulo de proteínas

relacionadas com a patogênese (PR), como as quitinases e glucanases sintetizadas pelas células que circundam a lesão (De Wit, 1992).

Além disso, após o reconhecimento do elicitor e da ativação da HR, ocorre ativação de uma cascata de transdução de sinais que leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), síntese de óxido nítrico, alteração do potencial de membrana e do estado de fosforilação das proteínas e ativação de genes envolvidos na resposta de resistência.

Vários papéis na resposta de defesa tem sido proposto para as ROS (Buchanan et al., 2000), entre eles promover a toxicidade do meio, pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que impossibilita o crescimento do patógeno, e formação de radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$) e superóxidos (O_2^-) que são altamente prejudiciais para lipídeos, ácidos nucléicos, proteínas e membranas celulares.

Em mamíferos, a formação de ROS está associada aos processos apoptóticos, o que pode indicar seu papel na morte celular durante a HR. Esta analogia tem sido reforçada pela identificação de sistemas similares ao sistema NADPH oxidase de neutrófilos de mamíferos, o $gp91^{phox}$ e Rac. O homólogo ao $gp91^{pho}$, identificado em *Arabidopsis* e arroz (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998), possui um motivo de ligação ao cálcio que funciona como conexão reguladora do influxo de íons induzida pelo patógeno. O influxo de Ca^{2+} ativa a proteína análoga à proteína NADPH oxidase, que, por sua vez, é capaz de promover a redução de uma molécula de oxigênio gerando O_2^- que é rapidamente convertido a H_2O_2 por ação de catalases ou da ascorbato dismutase (McDowell e Dangl, 2000). Segundo McDowell e Dangl (2000), pouco se sabe sobre o complexo Rac, mas fenótipos de plantas transgênicas que expressam constitutivamente uma variante qualquer do Rac indicam que ele é um regulador da morte celular em plantas.

Em condições apropriadas, H_2O_2 e O_2^- podem converter os ácidos linoléico, linolênico e araquidônico em peróxidos lipídicos que atuam como moléculas sinalizadoras. Os peróxidos de hidrogênio poderiam atuar ainda como substrato para a peroxidação lipídica, envolvendo lipoxigenases, levando à formação de precursores do ácido jasmônico que também é uma molécula sinalizadora (Marcelino, 2002).

Durante a resposta de defesa, o H_2O_2 não é removido e ele pode apresentar funções importantes, tais como: atuar diretamente como composto tóxico contra o patógeno; promover o aumento de radicais $OH^{\bullet}$ livres; quando na presença de íons ferro, promover síntese de ligações cruzadas entre hidroxiprolinas e glicoproteínas ricas em prolina à matriz polissacarídica, reforçando a parede celular; induzir síntese do ácido

benzóico que atua como sinalizador; ativar genes dos mecanismos de proteção; alterar o balanço Redox, promovendo a transcrição de genes (Buchanan et al., 2000).

Algumas investigações têm sido feitas para identificar a interação entre ácido salicílico (AS), óxido nítrico (NO) e ROS (McDowell e Dangl, 2000). NO é requerido para a HR, como foi demonstrado em experimentos com a enzima óxido nítrico sintase (NOS) que apresenta atividade aumentada de quatro a cinco vezes em plantas de tabaco infectadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV) (Durner et al., 1998). O AS está diretamente relacionado com a ativação de genes que codificam as proteínas de resistência (PR) e aumentam a resistência a vários tipos de patógenos.

Estudos com plantas de tabaco indicam que o NO exógeno promove a expressão de genes de resposta a patógenos e que esta indução gênica é dependente do acúmulo de AS. A conclusão destes estudos diz que tanto o AS quanto o NO atuam de forma sinérgica para potencializar a ação das ROS, agindo cooperativamente para o mecanismo de amplificação de sinais (McDowell e Dangl, 2000). Enfim, ROS e NO estimulam a síntese de AS que, por sua vez, potencializa respostas dependentes de ROS e NO.

A ação conjunta das ROS, NO e AS leva à ativação de uma resposta em toda a planta por meio da ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR). Esta resposta é mais duradoura e efetiva contra os patógenos. Para ocorrer é necessário que a infecção inicial resulte na formação de lesões de necrose como parte da HR ou como sintoma da doença. Na ativação da SAR, um lipídio sinalizador, derivado de células infectadas, interage com a proteína DIR1 (proteína de transferência de lipídeos) e promove o acúmulo de AS e o recrutamento da proteína NPR1 (proteína que possui uma repetição de anquirina e é responsável pela regulação da transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade). Experimentos com adição de AS em brotos de *Arabidopsis* demonstraram que o AS promove o deslocamento de NPR1 do citoplasma para o núcleo onde ela se liga a vários fatores de transcrição com motivos TGA (TGACG) ou fatores de transcrição WRKY, resultando na expressão de vários genes *Pr* (relacionados à patogenicidade) (Hammond-Kosak e Parker, 2003).

Outro tipo de resistência tem sido verificado em plantas que apresentam resposta a cepas não patogênicas da bactéria colonizadora de raízes *Pseudomonas fluorescens*. Esta resposta é conhecida por SIR (resposta sistêmica induzida) e caracteriza-se por ser independente da acumulação de AS e não estar associada com a ativação da expressão de proteínas PR. No entanto, é uma resposta que requer a ativação de rotas de sinalização mediadas por ácido jasmônico (AJ) e etileno e da proteína NPR1. A resposta

de defesa dependente de AJ-etileno é ativada por patógenos que matam as células da planta para obterem nutrientes (patógenos necrotróficos). AJ e etileno são reguladores do crescimento das plantas sugerindo que existe uma sobreposição dos componentes regulatórios da defesa e do desenvolvimento (McDowell e Dangl, 2000). O papel dessas duas moléculas sinais na resposta de defesa a patógenos em plantas ainda não está bem eluciado.

McDowell e Dangl (2000) descrevem um terceiro tipo de resposta sistêmica que é denominada de resistência independente de SAR (ISR) caracterizada por não envolver expressão de proteínas PR, mas promover o acúmulo de AS. Um supressor de NPR1, denominado SON, é capaz de inibir a proteína NPR1 e ativar rotas dependentes de AS, o que leva a crer que as rotas dependentes de AS podem ser desacopladas do gene *NPR1* e que existem pontos de convergências das vias de sinalização das respostas de defesa. O cruzamento entre as vias de sinalização permite a planta uma fina sintonia entre o programa de defesa e a resposta a cada tipo de patógeno conferindo maior eficiência que a resposta individual de cada rota (Nimchuk et al., 2003).

Entender as interações entre planta e patógenos e seus mecanismos de resistência é importante para possibilitar o controle de grandes epidemias em culturas agrícolas, bem como elucidar mecanismos de sinalização ativados em resposta a uma situação de estresse ou a um patógeno, e também esclarecer como os diversos organismos de espécies diferentes se relacionam promovendo evolução das respostas a patógenos.

O desenvolvimento de cultivares de soja resistente e com alta produtividade pode ser conseguido se os mecanismos moleculares de resistência a doenças e da interação planta-patógeno estiverem melhores esclarecidos. Com metas na obtenção de cultivares mais produtivos, a identificação e utilização de fontes de resistência aos principais patógenos constituem uma das estratégias para a obtenção de variedades comerciais mais produtivas. Segundo Stacey et al. (2004), o melhor entendimento da fisiologia da soja e a habilidade em manipular a resistência a várias doenças desta cultura podem resultar na redução da utilização de pesticidas além de proporcionar outros benefícios para o meio ambiente.

2.3. Genes de resistência e proteínas R

Variação na interação planta-patógeno pode ser atribuída à presença ou ausência de genes de resistência (*R*), cujos produtos são capazes de responder ao produto do gene *Avr* condizente (Flor, 1971). Estes genes são ativados em resposta à invasão de um

patógeno, que induz ativação rápida e localizada de mecanismos que promovem a proteção da planta contra aquele patógeno. Estes genes condicionam resistência a uma gama de patógenos não relacionados, e os seus produtos, junto com seus correspondentes genes de avirulência (*Avr*), são componentes críticos de resistência de espécies ou raças específicas (Staskawicz et al., 1995; Dangl e Jones, 2001).

Os genes *R*, uma vez ativados, desencadeiam cascatas de transdução de sinal que culminam com o fenótipo de resistência e apresentam duas funções básicas:

- reconhecimento molecular do ligante derivado do gene *Avr*;
- ativação da resposta de defesa por cascata de transdução de sinais levando a rápida indução de genes de resposta.

Dezenas de genes *R*, contra muitos diferentes patógenos, têm sido clonados de um grande número de espécies de plantas. O ritmo das descobertas de genes *R* em plantas de culturas de interesse agronômico, como arroz, cevada, milho e tomate, teve um forte aumento nos últimos cinco anos, devido a avanços nas tecnologias de isolamento e mapeamento desses genes (Hammond-Kosak e Parker, 2003). As proteínas codificadas por eles podem ser agrupadas em várias superfamílias, com base em domínios protéicos.

A classe predominante de genes *R* codifica proteínas com uma repetição rica em leucina com sítio de ligação a nucleotídeo (NBS-LRR) e domínio N-terminal variável. Menos comum, é a classe das proteínas cinases serina/treonina e as LRR extracelulares (eLRR) que possuem um domínio transmembrana e um curto domínio C-terminal ou uma cinase ligada (Hammond-Kosak e Parker, 2003).

As proteínas NBS-LRR apresentam repetições de leucina alternadas com aminoácidos com radicais hidrofóbicos (LxxLxLxxN/CxL). Sete grupos destas repetições formam uma folha-ß com um *loop* adjacente. Possuem de 20 a 29 resíduos de aminoácidos, arranjados em tandem de 20 a 30 vezes, em diferentes proteínas que conferem resistência espécie-específica. Estas repetições criam uma superfície que detecta variações nos ligantes dos patógenos por meio de interação proteína-proteína e receptor-ligante. O tamanho dos domínios LRR em muitas proteínas R permite o reconhecimento de diferentes ligantes e a participação na sinalização por meio de interação com proteínas (Buchanan et al., 2000).

Estas proteínas podem ser divididas em subclasses dependendo do domínio ligado ao seu N-terminal. Um putativo *coiled coil* (CC) pode ser encontrado em produtos dos genes *RPP-8* (McDowell et al., 1998) e *RPP*-13 (Bittner-Eddy et al., 2001) que reconhecem o patógeno *Peronospora parasitica*. Um outro domínio, semelhante ao

domínio citoplasmático codificado pelo gene de desenvolvimento TOLL de Drosófila ou ao receptor IL-1 (TIR) codificado pelo gene de interleucina de mamíferos, pode ser encontrado em proteínas codificadas pelos genes *RPP-5* (Parker et al., 1997) ou *RPP-1* (Botella et al., 1998).

O sítio de ligação a nucleotídeo (NBS) está frequentemente associado a motivos conservados ARC, que são similares a proteínas CED-4 de nematóides e ao domínio NBS de proteínas apoptóticas animais APAF-1. Estudos verificaram que a dimerização das proteínas APAF-1 leva à ligação e à hidrólise do ATP ativando a resposta de defesa e regulando a morte celular (Sinapidou et al., 2004). Genes com domínios NBS não apresentam um mecanismo claro de transdução de sinais, no entanto, devido à sua similaridade com as proteínas APAF-1, um modelo análogo à cascata de sinalização que envolve APAF-1 e CED-4, foi proposto para os genes *R* com domínios NBS. Análise de mutações no sítio NBS, que alteram resíduos específicos, verificaram que a atividade da proteína fica interrompida não cumprindo seu papel na defesa da planta (Nimchuk et al., 2003). Alguns autores sugerem ainda que o NBS seja a região adaptadora capaz de ligar o C-terminal LRR ao domínio de reconhecimento de vários efetores.

O gene *RRS1* de *Arabidopsis*, que confere resistência à bactéria *Ralstonia solanacearum*, codifica uma proteína NBS-LRR que apresenta um domínio WRKY adicionado ao seu C-terminal. As proteínas codificadas que comtém estes motivos são fatores de transcrição, induzidos na resposta de defesa, que se ligam a *cis*-elementos de vários promotores de genes ativados por patógenos. A proteína RRS1 pode se ligar ao DNA e ativar outros genes que conferem o fenótipo de resistência (Hammond-Kosack e Parker, 2003).

O gene *Cf-9*, isolado por Jones et al. (1994), que responde ao *Cladosporium fulvum*, codifica uma proteína que apresenta um domínio LRR extracitoplasmático ancorado à membrana, evidenciando seu envolvimento na sinalização da defesa. O produto do gene *Xa21* (Wang et al., 1998) está localizado no citoplasma e contém uma serina/treonina cinase, o que sugere que a proteína codificada por ele apresenta importante papel na resistência espécie-específica, mas requer outras proteínas que possuam domínios NBS-LRR para atuar na defesa da planta (Buchanan et al., 2000).

O gene *Pto* do tomate (Martin et al., 1993), que confere resistência à bactéria *Pseudomonas syringae*, representa uma exceção entre as proteínas codificadas por genes *R*, pois codifica uma serina/treonina cinase citoplasmática que requer interação com a proteína Prf, codificada pelo gene *Prf*. A Prf possui um domínio NBS-LRR e monitora a interação do alvo de virulência *Avr-Pto* ao produto gênico *Pto*. Quando a

interação *AvrPto-Pto* é estabelecida a proteína Prf liga-se ao complexo e desencadeia a resposta de resistência (Lahaye, 2004). Este tipo de interação é conhecido como modelo guarda, descrito anteriormente, e tem sido comprovado com outras evidências experimentais que envolvem a proteína RIN4 que interage com o complexo formado pela proteína RPM1 de *Arabidopsis* e o Avr Rpm1 ou AvrB derivado da bactéria *Pseudomonas syringae*.

O gene *Hm1* do milho, que confere resistência ao fungo *Cochiobolus carbonum*, é o único gene de resistência que foge do modelo de interação gene-a-gene, pois não apresenta nenhum gene *Avr* envolvido na resposta de resistência. Este gene codifica a enzima HC-toxina redutase (HCTR) que destoxifica a HC-toxina produzida pelo fungo. HC-toxina é uma enzima que inibe a atividade da acetil deacetilase, enzima responsável pela deacetilação das histonas H_3 e H_4 durante os processos de transcrição.

Enfim, vários genes de resistência estão sendo isolados, caracterizados e classificados de acordo com o motivo estrutural da proteína que os mesmos codificam. Alguns dos principais genes de resistência que já foram isolados e caracterizados estão sumarizados na Tabela 1.

A soja é uma espécie que possui um mapa genético saturado (Cregan et al. 1999) e um sistema de transformação bem desenvolvido (Zhang et al., 1999) que facilita os trabalhos de clonagem de genes de resistência nesta planta. Um mapa genético de genes de defesa e análogos à resistência está sendo construído por Ai-Guo Tian et al. (2004). Outros autores também estão isolando e caracterizando vários genes de resistência da soja (Zhang et al., 1997; Liu et al., 2000; Wu et al., 2001; He et al., 2001, 2002 e 2003, citados por Ai-Guo Tian et al., 2004) com a finalidade de estabelecer avanços genéticos que permitam o entendimento do funcionamento do "sistema imune" das plantas que levem ao desenvolvimento de cultivares resistentes, impulsionando a produção de soja em todo o mundo.

2.4. As vias de sinalização da resposta de defesa

A ativação da resposta de defesa requer um sofisticado mecanismo que envolve a ativação de vias de sinalização específicas que promovem uma reprogramação da transcrição e do aparato de síntese de proteínas da planta. Dissecação genética da sinalização em *Arabidopsis* tem mostrado a existência de vias alternativas de sinalização que convergem a elementos *downstream* comuns. Duas dessas vias foram

Tabela 1 – Classe de genes de resistência isolados**.**

Classe	Gene *R*	Planta	Patógeno	Característica da proteína R*	Referência
1	*Hm1*	Milho	*Cochiobolus carbonum*	Toxina	Johal e Briggs, 1992
2	*Pto*	Tomate	*Pseudomonas syringae*	Cinase serina/treonina	Martin et al., 1993
3	*PSB1*	*Arabidopsis*	*Pseudomonas syringae*	Cinase serina/treonina	Swiderski e Innes, 2001
4A	*RPS2*	*Arabidopsis*	*Pseudomonas syringae*	CC-NBS-LRR ou LZ-NBS-LLR	Bent et al., 1994
	Mla1/ Mla6	Cevada	*Blumeria graminis f.sp.*	CC-NBS-LRR ou LZ-NBS-LLR	Zou et al., 2001
	R1	Batata	*Phytophora infestans*	CC-NBS-LRR ou LZ-NBS-LRR	Ballvora et al., 2002
	RPP8	*Arabidopsis*	*Peronospora parasitica*	CC-NBS-LRR ou LZ-NBS-LRR	McDowell et al., 1998
4B	*N*	Tabaco	*Vírus do mosaico*	TIR-NBS-LRR	Witham et al., 1994
	RPP4	*Arabidopsis*	*Peronospora parasitica*	TIR-NBS-LRR	Van der Biezen et al., 2002
4C	*Dm3*	Alface	*Bremia lactucae*	NBS-LRR	Meyers et al., 1998
4D	*RRS1*	*Arabidopsis*	*Rasltoria solanacearum*	NBS-LRR-WRKY	Deslandes et al., 2002
5A	*Cf-9*	Tomate	*Cladosporium fulvum*	eLRR	Jones et al., 1994
6	*Xa-21*	Arroz	*Xanthomonas oryzae*	eLRR-cinase	Song et al., 1995
7	*RPW8.1*	*Arabidopsis*	*Erysiphe cruciferum*	CC-ancorado a membrana	Xiao et al., 1998
8	*Rpg1*	Cevada	*Puccinia graminis*	Receptor de cinase acoplado à proteína G	Freialdenhoven et al., 1996

**Coiled coil* (CC), Sítio de ligação a nucleotídeos (NBS), Repetições ricas em leucina (LRR), zíper de leucina (LZ), homólogo ao domínio receptor de interleucina 1 (TIR), fator de transcrição WRKY (WRKY), repetição rica em leucina extracitoplasmática (eLRR).

definidas por meio de mutações nos genes *EDS1* (aumento da suscebilidade a doença 1) e *PAD4* (fitoalexina-deficiente 4) ou nos genes *NDR1* (resistência à doença raça não específica).

Os genes *EDS1* e *PAD4* afetam o mesmo espectro de genes de resistência e apresentam homologia com lipases catalíticas, embora nenhuma atividade enzimática tenha sido demonstrada para suas proteínas (Nimchuk et al., 2003). O gene *NDR*, um provável glicosilfosfatidilinositol (GPI), codifica uma proteína ancoradora de membrana. Em animais, proteínas GPI são encontradas em transportadores de lipídeos associados com chaperones como as HSP 70 e a HSP 90.

Aarts (1998), estudando os genes *EDS1* e *NDR1*, erificou que mutações no *NDR1* causam a perda da resistência conferida pelos genes *RPS2* e *RPS5* ao patógeno *Pseudomonas syringae*, que expressa genes *avrRpt2* e *avrRpt5*, respectivamente; e a incapacidade de resposta do gene *RPM1*, que confere resistência contra os genes *avrB e avrRpm1* de bactéria. As mutações em *EDS1* abolem a resistência conferida por genes de resistência *RPP*.

O uso de mutantes *eds1* e *ndr1* indica que as proteínas codificadas pelos genes *R* que apresentam domínios CC-NBS-LRR sinalizam sua resposta por meio da via *NDR1*; enquanto proteínas com domínios TIR-NBS-LRR ativam o mecanismo de defesa por meio da proteína *like-lipase EDS1* (Nimchuk et al., 2003). A função exata dessas proteínas ainda não é conhecida, mas sabe-se que as mutações *eds1* operam *upstream* à resposta de defesa mediada por AS e que os mutantes *npr1* são capazes de acumular AS, mas falham em manter o mecanismo da SAR implicando em uma resposta *downstream* à percepção do AS (Petersen et al., 2000). Alguns genes que dependem de *EDS1* também requerem *PAD4* para a resistência completa deixando evidente que estes dois componentes operam em uma mesma via de defesa.

Estudos realizados em cevada definiram os genes *Rar1* e *Rar2* como componentes de resistência a fungo mediada por *Mla12*. *Rar1* codifica uma proteína de ligação a zinco, muito conservada em plantas, drosófila e no homem. Esta proteína possui uma seqüência similar ao SGT1 (supressor do alelo G2 do SKP1) que é uma proteína que se liga ao complexo SCF (box-F-cullin-Skp1) e age como ubiquitina ligase que coordena a degradação de muitas proteínas regulatórias envolvidas na transdução de sinais. Com base nesta similaridade, acredita-se que a via de defesa específica *Rar1/SGT1* emprega degradação de proteína mediada por ubiquitinização para ativar a maquinaria da resposta de defesa da planta (Bonas e Lahaye, 2002).

Outro regulador importante da defesa emerge dos componentes da cascata das proteínas cinase ativadas por mitogênio (MAPKs). A cascata de MAPKs tem papel na regulação de genes que protegem a planta contra diferentes condições de estresse, e principalmente no estresse oxidativo.

MAPKs eucarióticas atuam em uma cascata de fosforilação irreversível que amplificam sinais específicos em respostas celulares. Em plantas, foi encontrada uma MAP cinase de tabaco (SIPK) que é ativada por AS, elicitores fúngicos e infecções virais (Liu et al., 2000). Os fatores de transcrição que controlam a expressão de vários genes são importantes substratos para as MAPKs, mas o papel preciso na percepção de estímulos externos e na resposta a patógenos em plantas ainda é pouco conhecido. Petersen et al (2000), trabalhando com mutantes *mpk4*, verificaram que estes mutantes exibem constitutiva SAR. A perda de função de MAPK4 promove o aumento dos níveis de AS, e similar a outros mutantes que acumulam AS, mutantes *mpk4* expressam constitutivamente marcadores de SAR que aumentam a resistência a patógenos.

O reconhecimento do patógeno por meio da interação Gene *R*-elicitor é seguido por uma amplificação desse sinal que leva a uma efetiva ativação de respostas de defesa. Em adição às espécies reativas de oxigênio (ROS), ao óxido nítrico e ao ácido salicílico, outros componentes, como *EDS1, NDR1 e PAD4,* são recrutados para caracterizarem diferentes vias de sinalização do sistema de defesa das plantas. Por meio da ativação dessas vias é que a planta desencadeia todo o mecanismo que leva à sua proteção contra ataques de patógenos.

A Figura 1 mostra uma visão global do mecanismo de sinalização envolvido na ativação da resposta de defesa. As principais cascatas de sinalização estão evidenciadas na figura, resaltando os controles regulatórios positivos e negativos, criando uma sinalização altamente interligada.

2.5. Estratégias para o desenvolvimento da genômica da resistência

Nas últimas duas décadas a identificação de genes têm utilizado o sequenciamento do cDNA de muitos genes em muitos organismos (Adams et al., 1991 e Okubo et al., 1991). Para clonar os genes de resistência dois dos principais métodos utilizados têm sido "transposon tagging" e a clonagem baseada em mapa.

A estratégia de "transposon tagging" permite a identificação de fenótipos suscetíveis devido à inativação dos genes *R* na planta hospedeira pela inserção de um elemento genético móvel. Os genes *Cf-9* de tomate, que confere resistência ao fungo

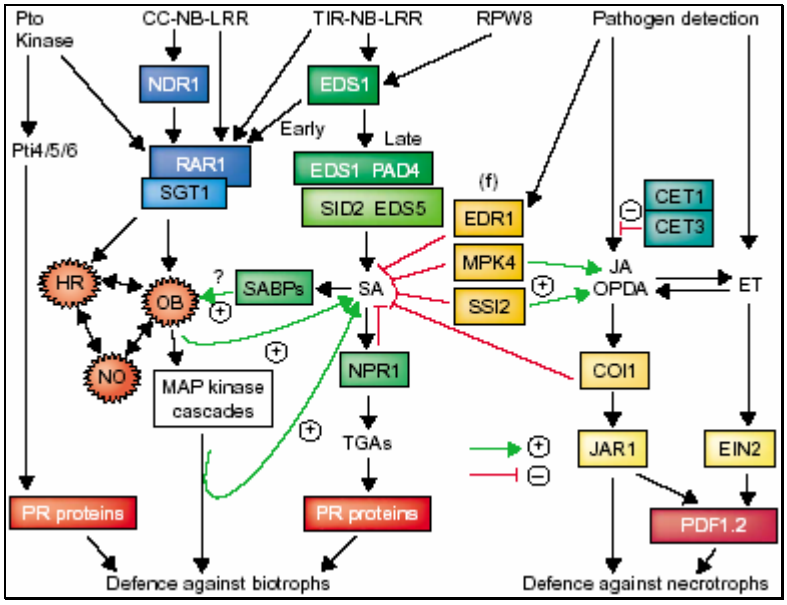

Figura 1. Visão global das vias de sinalização das respostas de defesa das plantas. Fonte: Currente Opinion in Biotecnology, 2003, 14: 177-193.

Cladosporium fulvum, e *N* de tabaco, que confere resistência ao vírus do mosaico do tabaco, foram clonados utilizando esta estratégia combinada a uma estratégia de seleção (Jones et al., 1994).

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

Descobertas feitas utlizando EST/cDNA tem conseguido estudar a expressão de genes *R* em *Arabidopsis* (Delseny et al., 1997), arroz (Ewing et al., 1999), milho (Fernandes et al., 2002) e soja (Shoemaker et al., 2002).

A utilização do sistema de duplo híbrido (Chien et al., 1991) para identificar proteínas que interagem diretamente com as proteínas de resistência também apresenta outro mecanismo de clonagem dos genes *R*. Tang et al. (1996) tiveram sucesso em identificar proteínas que interagiam com o produto gênico de *Pto* por meio desta estratégia. Mais recentemente, a mesma metodologia foi utilizada em *Arabidopsis* tendo como "isca" o gene *RPP*5 da classe TIR-NBS-LRR.

Um outro método que apresenta grande potencial no isolamento de genes de resistência, defesa e da via de transdução de sinal, é o *screening* de bibliotecas genômicas e de cDNA com sondas de DNA homólogas a genes de resistência. Martins (2000) caracterizou uma seqüência homóloga a genes de resistência, a partir de um *screening* realizado em uma biblioteca genômica da variedade de soja FT-Cristalina, utilizando um fragmento de RFLP, homólogo a genes de resistência, como sonda. A comparação da sequência de aminoácidos predita, em todas as possíveis ORFs, com outras existentes no *GenBank,* revelou similaridade da seqüência isolada com as proteínas "*Cf-2.1like*" de *Arabidopsis thaliana*, proteína de resistência a doenças similar a *Cf-2/Cf-5* de *Hordeum vulgare* e outras proteínas de resistência de *Lycopersicon*.

2.6. Caracterização da sonda A53-09

A sonda A53-09 está contida em um clone de RFLP A53-09 e pode ser obtida por sua liberação do sítio *Pst* I do vetor pBlueScript, por digestão com a enzima *Pst* I. Esta sonda corresponde a um fragmento de 1019 pb que contém uma seqüência de leitura aberta (ORF) que potencialmente codifica uma cadeia polipeptídica com 159 resíduos de aminoácidos, com três regiões conservadas que incluem: um domínio transmembrana compreendido entre as posições 4 e 24 da ORF, e dois domínios LRR nas posições 108 a 132 (LRR1) e 133 a 156 (LLR2). Na Figura 2 A são mostrados a sequência nucleotídica da sonda A53-09 e os domínios existentes nela. O trecho sublinhado corresponde à ORF que codifica uma proteína putativa, similar a proteínas codificadas por genes de resistência a doenças. A seqüência de aminoácidos dos potenciais domínios protéicos presentes na seqüência da sonda podem ser observados na Figura 2 B.

Muitas proteínas codificadas por genes de resistência (*R*) contêm repetições ricas em leucina (LRR) que consistem de estruturas moldadas em folhas ß-pregueadas, que atuam como prováveis determinantes da especificidade no reconhecimento de patógenos. Estes domínios são normalmente acompanhados de um domínio de ligação a nucleotídeo (NBS) (Young, 2000), e apresentam repetição de leucina alternada com aminoácidos hidrofóbicos. Possuem, aproximadamente, 24 aminoácidos que conferem resistência espécie-específica. Estas repetições criam uma superfície que detecta variações nos ligantes dos patógenos por meio de interação proteína-proteína e receptor-ligante. O tamanho dos domínios LRR em muitas proteínas R permite o reconhecimento de diferentes ligantes e participa da sinalização por meio da interação com proteínas.

A)

```
     A  G  S  K  G  V  A  G  R  K  S  M  R  P  M  Q  L  V  *  S
1    gcagggagtaaaggggttgcaggaagaaaaagcatgagacccatgcagctggtataatcg  60

     *  R  K  I  S  S  C  F  L  E  D  M  *  V  V  E  *  G  N  M
61   tgaaggaagatatcatcgtgctttctagaagatatgtaggtagtggaataagggaatatg  120

     V  V  R  I  F  H  F  I  F  S  V  L  L  V  G  P  C  S  L  H
121  gttgttaggatattccattttatcttttctgttttgcttgtggggccttgttccctgcat  180
     N  S  Y  I  C  R  *  I  K  R  F  *  Y  Q  K  I  *  Q  Q  V
181  aacagctatatatgtagatgaattaagcgcttttgatatcagaaaatataacagcaagtt  240
     L  P  *  S  L  S  S  S  S  S  M  E  V  P  S  P  R  N  *  V
241  ctcccttagtctctctcttcctcttcttctatggaggttcctagccctcgaaactaggtg  300
     V  H  V  L  K  L  G  S  *  H  V  V  R  H  F  *  S  *  M  S
301  gttcacgttctcaagcttggttcctaacatgtggttagacacttttaatcctgaatgtct  360
     P  C  R  H  I  Y  L  Y  I  C  V  H  F  A  T  T  T  I  S  G
361  ccttgtagacatatatacctctacatatgtgtgcattttgcaaccaccaccattagtgga  420
     I  K  F  *  M  Q  T  L  L  W  Y  I  S  Y  I  G  I  V  S  S
421  ataaaattttaaatgcaaacccttctatggtatatatcctatataggcattgttagtagt  480
     K  Y  Q  P  *  T  R  K  L  W  I  Q  P  F  S  F  S  F  F  F
481  aaataccaaccgtgaaccagaaaattgtggattcaacctttttcgttttccttcttcttc  540
     M  A  V  L  Y  A  T  H  V  L  L  L  I  L  S  T  A  T  T  L
541  atggcagtgctatatgcaactcatgttcttctcttgatattgtccactgcaacaactctc  600
     H  F  S  A  S  K  A  A  R  L  N  M  T  C  S  E  K  E  R  N
601  cacttcagtgcaagcaaggcagcaaggctcaatatgacttgcagcgagaaggaaaggaat  660
     A  L  L  S  F  K  H  G  L  A  D  P  S  N  R  L  S  S  W  S
661  gcactcctcagcttcaagcatggactagcagacccttcaaacaggctttcatcgtggtct  720
     D  K  S  D  C  C  T  W  P  G  V  H  C  N  N  T  G  K  V  M
721  gacaaatcggattgctgtacatggccaggggttcactgcaacaacacaggtaaagtcatg  780
     E  I  N  L  D  T  P  A  G  S  P  Y  R  E  L  S  G  E  I  S
781  gaaatcaatcttgacacacctgcgggctctccctatagggagttgagtggagagattagt  840
     P  S  L  L  E  L  K  Y  L  N  R  L  D  L  S  S  N  Y  F  V
841  ccttctttgcttgaactaaaatatttgaatcgtttggacttgagttcaaattattttgtt  900
     L  T  P  I  P  S  F  L  G  S  L  E  S  L  R  Y  L  D  L  S
901  cttactccaataccaagcttcctaggctcattggagagtctgagatacttggaccttagc  960
     L  S  G  F  M  G  L  I  P  H  Q  L  G  N  L  S  N  L  Q ▲
961  ttaagtgggttcatgggattaatccctcatcaactaggaaacctctcaaacctgcag  1017
```

B)

MAVLYATHVLLLILSTATTLHFSASKAARLNMTCSEKERNALLSFKHGLADPSNRLSSWSDK SDCCTWPGVHCNNTGKVMEINLDTPAGSPYRELSGEISPSLLELKYLNRLDLSSNYFVLTPIP SFLGSLESLRYLDSLSGFMGLIPHQLGNLSNLQ

Figura 2 – A) Seqüência de nucleotídeos da sonda A53-09 e a correspondente seqüência de aminoácidos predita. As letras minúsculas representam a seqüência de nucleotídeos enquanto as letras maiúsculas representam a seqüência de aminoácidos predita. Os trechos em negrito e itálico sublinhados correspondem a uma potencial ORF contida no primeiro quadro de leitura aberta; seu início está marcado pela letra M e o fim por um ▲. Asteriscos no meio da seqüência representam possíveis códons de parada. **B)** Potenciais domínios presentes na seqüência de aminoácidos predita para a sonda A53-09. Em vermelho está representado o domínio transmembrana, em azul o domínio LRR1 e em verde, os domínio LLR2.

Algumas proteínas com domínio NBS-LRR apresentam atividade de cinases e podem se ligar a ATP ou GTP para ativar a resposta de defesa. Mutações no sítio NBS, que alteram resíduos específicos dentro do NBS impedem a atividade da proteína.

Dados de cristalografia de estruturas de LRR sugerem que uma seleção diversificada ocorre dentro da seqüência de aminoácidos das LRRs que estão expostas a solventes no lado extracelular da membrana, que aumenta a gama de proteínas reconhecidas por estas estruturas (Jones e Jones, 1996). Mackey (2002) cita que estudos de proteínas R quiméricas reforçam a idéia de que os domínios LRRs contribuem para a especificidade da proteína e podem mediar as interações com outras proteínas da planta como ocorre com a proteína Pi-ta do arroz, que interage com a AvrPita sintetizada pelo fungo *Magnaporthe grisea*, que ataca o arroz.

A elucidação de mecanismos envolvidos na resposta de defesa em plantas, bem como a clonagem de diferentes genes, direta ou indiretamente envolvidos, desde a indução até a resposta final ao ataque de patógenos, irá permitir que programas de melhoramento genético futuros possam desenvolver cultivares resistentes e mais produtivos capazes de atender às necessidades crescentes do comércio mundial.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas nestes experimentos plantas de:

a) Soja FT-Cristalina: cultivar comercial da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) fornecido pelo Banco de Germoplasma do Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV, resistente ao crestamento foliar (Cercospora kikuchii) e à mancha olho de rã (C. sojina) (Yorinori, 1991).

b) Soja Bossier: cultivar comercial que é suscetível ao crestamento foliar, também cedido pelo Programa de Melhoramento da Soja do BIOAGRO/UFV.

O plantio das sementes de soja FT-Cristalina e Bossier foi feito em solo adubado com NPK (4-14-8). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do BIOAGRO sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura ambiente entre 22 a 25 ^{o}C.

A variedade FT-Cristalina foi também utilizada para a construção da biblioteca de cDNA usada neste trabalho (Marcelino, 2002).

3.2. Patógeno

Esporos do fungo *Cercospora sojina,* pertencente à raça 4, isolado 1, obtidos junto à Micoteca do Programa de Melhoramento de Soja do Departamento de Fitotecnia da UFV foram utilizados para inocular as plantas de soja das variedades FT-Cristalina e Bossier.

3.3. Inoculação do patógeno e coleta das folhas para extração do RNA

No estádio V_3 de desenvolvimento, aproximadamente 5,0 x 10^4 uredosporos/mL de *C. sojina* foram utilizados para a inoculação da soja. A suspensão foi aspergida com uma bomba de *spray* sobre as folhas primárias das variedades resistente e suscetível, sendo preservados da inoculação os vasos determinados como controles de cada variedade. Foram inoculadas 10 plantas de cada variedade. As 10 plantas controle foram aspergidas apenas com água.

Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, sendo irrigadas em intervalos regulares para manter as folhas sempre úmidas e permitir o ataque do fungo. A temperatura na estufa era mantida em torno de 20°C e a umidade relativa do ar superior a 95%.

Folhas primárias de soja resistente inoculada e não inoculada, soja suscetível inoculada e não inoculada foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração do RNA. A coleta do material foi feita a intervalos de tempo de 0, 96, 192 e 288 horas após a inoculação, sendo coletadas folhas de cada um dos quatro materiais.

As folhas coletadas no tempo zero e o material não inoculado constituem os controles do experimento. A amplitude do intervalo foi determinado de forma que se pudesse observar os sintomas típicos da doença, que geralmente aparecem por volta dos 10 dias após a inoculação do patógeno.

3.4. *Screening* da biblioteca de cDNA

A análise da biblioteca de cDNA foi realizada conforme descrito por Benton e Davis (1977). Esta biblioteca foi construída por Marcelino (2002) utilizando o vetor Uni-Zap XRII do "cDNA Synthesis Kit". Os insertos foram ligados a adaptadores com sítios para as enzimas *Eco* RI e *Xho* I e clonados, em sentido sense, no vetor. Este vetor permiti uma simples e eficiente excisão e recircularização do inserto clonado pois sua inserção ocorre dentro do vetor lambda. Durante a exicisão deste vetor ocorre a liberação de um fagomídeo que contém o inserto de interesse.

Inicialmente, células hospedeiras *E. coli* XL1-Blue MRF' foram crescidas em 50 mL de meio LB suplementado com 0,2% de maltose e $MgSO_4$ 10 M, por 4 a 6 h sob

agitação de 180 RPM, até atingir OD_{600} = 1,0. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5000 *g* por 10 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* diluído para OD_{600} = 0,5 em $MgSO_4$ 10 M, para se obter cerca de 2,5 x 10^8 células/mL. Estas células foram armazenadas por até dois dias para assegurar máxima eficiência na infecção.

Uma vez preparadas, as células hospedeiras foram infectadas com fagos recombinantes. Esta infecção se deu pela incubação de 200 μL de suspensão de células hospedeiras com alíquotas contendo 10^5 fagos recombinantes (quantidade equivalente à necessária para formação de 200 pfu – unidades formadoras de placas de lise) durante 15 min, a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados às células, 3,0 mL de meio NZY Top ágar (1% de caseína hidrolisada (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 0,5% de NaCl (p/v), 0,2% de $MgSO_4$ (p/v) e 0,7% (p/v) de agarose) com posterior plaqueamento sobre placas de Petri (150 mm de diâmetro), contendo meio NZY ágar (meio NZY Top ágar sem agarose e acrescido de 1,5% (p/v) de ágar). As placas foram incubadas a 37°C por 6 a 8 h para a formação de placas de lise. Antes da transferência de placas de lise para a membrana de náilon, as placas de Petri foram resfriadas a 4°C por 2 h.

As placas de lise formadas foram transferidas para membranas de náilon Hybond-N^+ (AMERSHAM PHARMACIA). A membrana foi deixada sobre a placa por 3 min à temperatura ambiente para transferência dos fagos. As placas de petri foram marcadas para posterior localização de eventuais clones positivos. As membranas foram então submetidas à desnaturação em solução de NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M por 2 min; em solução NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 por 5 min, e depois em solução de neutralização Tris-HCl 0,2 M, pH 7,5 e SSC 2X por 30 s. O DNA das placas de lise foi imobilizado nas membranas utilizando-se radiação ultravioleta a uma potência de 120.000 microjoules/cm^2 por 30 s no "Stratalinker UV Crosslinker" (STRATAGENE). Estas membranas foram armazenadas à temperatura ambiente até sua utilização. As placas foram guardadas a 4°C para coleta das placas de lise positivas.

3.5. Obtenção e marcação da sonda

A sonda A53-09 utilizada neste trabalho foi obtida pela amplificação do clone de RFLP A53-09 cedido pelo Dr. Rafalski (DuPont, EUA) e pertencente a uma biblioteca genômica da variedade de soja Bônus clonada no sítio *Pst* I do vetor pBlueScript (STRATAGENE) (Rafalski e Tingey, 1993).

A sonda A53-09 consiste de fragmento de 1019 pb e é homóloga a genes de resistência a doenças em soja (Barros et al., 2000). Após sua liberação do sítio *Pst* I do vetor pBlueScript, o DNA plamidial foi digerido em reação de restrição com a enzima *Pst* I. Sua quantificação, assim como a análise da integridade do DNA, foram realizadas em gel de agarose 0,8%, utilizando-se padrões de concentrações conhecidas. O fragmento da sonda foi excisado do gel e purificado usando o "QIAquick Gel Extration Kit" (QIAGEN INC).

A marcação foi feita com fosfatase alcalina termotolerante utilizando o kit GeneImages AlkPhos (AMERSHAM), conforme recomendações do fabricante. Aproximadamente 10 ng/µL de sonda foram desnaturados a 100°C por 5 min, incubados no gelo por mais 5 min e adicionados ao tampão de reação, ao reagente marcador e à solução de "crosslinker" e então, incubados a 37°C por 30 min. A sonda foi deixada no gelo por no máximo 2 h, até o seu uso.

3.6. Hibridização

Para as hibridizações, foi utilizado o Kit Gene Images AlkPhos (AMERSHAM PHARMACIA) seguindo protocolo do fabricante. As colônias já transferidas para as membranas foram novamente hidratadas em água destilada e pré-hibridizadas em solução de hibridização (NaCl 0,5 moles/L, reagente de bloqueio 4% e tampão de hibridização) por 15 min, a 50°C. A sonda marcada foi misturada à solução de hibridização, e incubada durante a noite a 50°C sob agitação. Então, as membranas foram tratadas com soluções de lavagens. A primeira lavagem foi feita com solução de uréia 2 M, SDS 01%, fosfato de sódio 0,5 mM pH 7, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 10 mM e reagente de bloqueio 0,2%, à temperatura de 50°C, por 10 min. A segunda lavagem foi feita com solução de Tris-base 1 M, NaCl 2 M e $MgCl_2$ 2 mM, à temperatura ambiente, por 5 min.

As membranas lavadas foram expostas ao reagente de detecção CPD-*Star*, 30 µl/cm^2 (AMERSHAM PHARMACIA) por 5 min. Após 5 min, o excesso de reagente foi removido e as membranas foram cobertas com filme PVC e expostas ao filme de raio-X (Bio Max^{TM}ML, KODAK) por 2 h. Nesta etapa, a fosfatase alcalina do complexo formado reage com o CPD-*Star*, formando um composto quimioluminescente. O filme foi revelado com solução reveladora por 2 min seguida de solução fixadora por mais 2 min, para a detecção do sinal quimiluminescente, e então, colocado para secar.

Após a revelação, os clones hibridizados puderam ser visualizados como manchas escuras formadas no filme de raio-X. Placas de lise positivas foram capturadas e armazenadas em meio SM (NaCl 0,58%, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,2%, Tris-HCl 1 M e gelatina 0,1%) contendo 0,2% de clorofórmio. Os clones foram armazenados a 4°C até sua utilização. As pfus positivas, resultantes do primeiro *screening*, foram utilizadas em um segundo e terceiro *screenings* a fim de isolar clones comprovadamente positivos.

3.7. Excisão do fagomídeo pBluescript do vetor Uni-Zap XR

Após o isolamento das placas de lise contendo os fagos foi realizada a excisão *in vivo* dos fagomídeos que contém insertos homólogos à sonda A53-09 do vetor Uni-Zap XR, conforme instruções contidas no Kit "cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit" (STRATAGENE). Esta estratégia elimina a etapa de subclonagem, uma vez que a excisão permite que o inserto seja caracterizado como em um sistema plasmidial.

Para a excisão, 200 μL de suspensão da célula hospedeira XL1-Blue MRF', previamente preparada como descrito anteriormente, foram co-infectados com $1x10^5$ fagos recombinantes, oriundos de uma placa de lise positiva, e $1x10^6$ partículas do fago "helper ExAssist". A mistura foi incubada por 15 min, a 37°C, seguida da adição de 3 mL de meio LB, e novamente incubada a 37°C, sob forte agitação, por 2 h e 30 min para permitir a excisão dos fagomídeos.

Depois, estas células foram incubadas a 70°C por 20 min e centrifugadas a 1000 *g* por 15 min. Do sobrenadante foram retirados 100 μL contendo os fagomídeos e incubados com 200 μL de células hospedeiras de *E. coli* SOLR por 15 min a 37°C. As células hospedeiras foram crescidas e preparadas conforme descrito anteriormente. A célula hospedeira *E. coli* SOLR, durante a excisão do fagomídeo, garante que se formem apenas colônias transfectadas, pois é resistente à infecção do fago lambda e não permite a replicação do fago "helper".

Decorrido o período de incubação, 200 μL da mistura foram plaqueados em meio LB sólido acrescido de 500 mg/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 12 h para isolar colônias contendo o fagomídeo excisado, que foi submetido à extração de seu DNA para posterior sequenciamento.

3.8. Extração DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi utilizada para a obtenção do DNA dos fagomídeos excisados do vetor Uni-Zap XR e para a obtenção da sonda A53-09 (inserto isolado) utilizada nas hibridizações para a captura destes clones.

O isolamento do DNA plasmidial foi feito pelo método de purificação em colunas, de acordo com o "Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System" (PROMEGA). Células hospedeiras *E. coli* XL1-Blue MRF'foram submetidas à lise alcalina após crescimento em meio LB, contendo 100 μg/mL de ampicilina, por 12 a 16 h. Então, foram centrifugadas a 5.000 *g*, por 2 min, a 4°C. A ressuspensão foi feita em solução de ressuspensão de células (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 20 mM e RNase A na concentração final de 100 mg/mL). Em seguida, a solução de lise (NaOH 0,2 M e SDS 1%) foi adicionada à mistura com incubação por 5 min à temperatura ambiente. A esta mistura foi adicionada a solução de protease alcalina, prolongando a incubação por mais 5 min. Posteriormente, a solução de neutralização (hidrocloreto de guanidina 4,09 M, acetato de potássio 0,75 M e ácido acético glacial 2,12 M) foi incorporada ao sistema.

Uma centrifugação a 13.000 *g,* por 10 min foi realizada para separar o DNA dos resíduos insolúveis e do DNA cromossômico. As resinas pré-empacotadas foram utilizadas para isolar o DNA plasmidial, que foi lavado com solução de lavagens de colunas (acetato de potássio 162,8 mM, Tris-HCl 22,6 mM pH 7,5, EDTA 0,109 mM pH 8,0 e etanol 95%) conforme as recomendações do fabricante. A eluição foi realizada com água livre de nucleases.

O DNA plasmidial foi digerido com enzimas de restrição para confirmar os clones positivos e estimar seus tamanhos.

3.9. Sequenciamento do DNA

O DNA extraído de cada clone foi seqüenciado utilizando o "ABI PRISM BigDye III Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (APPLIED BIOSYSTEMS). Este "kit" é adequado para o sequenciamento de DNA usando o "ABI PRISM 377 Genetic Analyzer" (APPLIED BIOSYSTEMS). As reações de sequenciamento foram baseadas na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger et al. (1977).

Para o sequenciamento, foram realizadas amplificações lineares por PCR, utilizando o termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS), modelo 9.600. O programa de amplificação consta de um período de desnaturação a 96°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de amplificação (96°C por 30 s, 50°C por 20 s e 60°C por 4 min), e período de extensão de 7 min a 72°C. Estas reações foram realizadas com um volume final de 20 μL contendo 8 μL de "mix" fornecido no Kit de sequenciamento, 10 pmoles do *primer* (T_7 ou T_3 (GIBCO) que pareiam em sítos do vetor pBluescript ou *primers* internos específicos para cada clone isolado) e 300 ng do DNA a ser seqüenciado.

O produto de extensão obtido pela reação de sequenciamento foi purificado utilizando 2 μL de acetato de sódio 3 M e 50 μL de etanol 96% (v/v) e incubado à temperatura ambiente por 15 min. Os fragmentos foram coletados por centrifugação a 16.000 *g* por 20 min. O *pellet* foi lavado com 200 μL de etanol 70% (v/v), centrifugado por 5 min e seco à temperatura ambiente, e, em seguida, ressupendido em 5 μL do tampão de corrida (16,67% (v/v) volume de tampão de corrida - blue dextran 50 mM e EDTA 25 mM – e 83,33% (v/v) volume de formamida 99,5%), desnaturado a 95°C por 5 min e mantido no gelo até a sua aplicação.

Os produtos da extensão foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 4,5% e a fluorescência emitida foi coletada por uma câmara CCD, sendo a informação processada pelo equipamento. Os dados foram automaticamente convertidos em sequências de desoxinucleotídeos.

Após o sequenciamento dos clones com os *primers* T_7 e T_3, *primers* internos foram desenhados com auxílio do Programa Primer3 Input Program, (http://www.genome.wi.mit.edu//cgi-bin/primer/primer3.cgi), para obter a sequência completa dos fragmentos clonados. Este programa permite a escolha do tamanho do fragmento a ser amplificado, o número de nucleotídeos dos *primers*, e avalia as condições iônicas da reação de PCR indicando qual *primer* deve ser escolhido para trabalho. As sequências dos *primers* podem ser observadas na Tabela 2.

3.10. Análise das sequências

As análises das sequências de nucleotídeos dos clones isolados foram realizadas pelo programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.) e a busca por similaridades

Tabela 2. *Primers* específicos utilizados no sequenciamento e nas reações de RT-PCR.

Clone	*Primer*	Sequência (5'→ 3')
A5309-47	Lox-F	TTG AAT GGG ATG ATG GGA GT
	Lox-R	AAC TGG TCC ACA ACG GTT TC
A5309-71	Dessat-F	GAG GGT TGA CAT GGC TAA GG
	Dessat-R	TAA CGC CAT GAT GCT TCT TC
A5309-72	Perox-F	CCT CCC AGA CCA CAA TGA GT
	Perox-R	TTC ATT GAA CCA GCC CAT TT
Actina 3	Foward	CCCCTCAACCCAAAGGTCAACAG
	Reverse	GGAATCTCTCTGCCCCAATTGTG
T3		ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7		TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

com outras seqüências depositadas no *GenBank* feita usando o programa BLAST (Altschul et al., 1997). A predição de possíveis ORFs (seqüência de leitura aberta) foi realizada com o programa ORF Finder, ambos do "National Center for Biotechnology Information" – NCBI - (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e por meio do Programa *SixFrame*. A predição dos possíveis domínios protéicos das ORFs foi feita usando o programa Pfam do Sanger Center (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml).

Para determinar a identidade entre os clones e a sonda, bem como predizer os resíduos de aminoácidos codificados por eles, foi utilizado o programa de alinhamento de seqüências *ClustalW,* disponível no endereço eletrônico http:\\www.workbench.sdsc.edu (Universidade de San Diego, CA, EUA).

3.11. Extração de RNA total

Com a finalidade de verificar a expressão gênica dos clones positivos capturados foi realizada a extração do RNA total das folhas de soja inoculadas e não inoculadas com o patógeno. As amostras foram coletadas de plantas de FT-Cristalina e Bossier, no estádio V3 de desenvolvimento.

Aproximadamente 2 g de folhas de soja foram triturados em nitrogênio líquido e misturados a 18 mL de tampão NTES [0,1 M de NaCl; 0,01 M de Tris-HCl pH 7,5; 1,0 mM de EDTA (ácido etilenodiaminatetracético) e 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio)

e 12 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) (Wadsworth et al., 1988) mantidas sob forte agitação por 15 min. Para separar as fases orgânica e aquosa a mistura foi centrifugada a 16.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi separado, a ele foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 2 mM e 2 volumes de etanol 96% (v/v) e em seguida, a mistura foi incubada por 1 hora a -20°C.

Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a 16.000 *g* por 15 min, o *pellet* lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspenso em água. O mesmo volume de cloreto de lítio 4 moles/L foi adicionado para permitir a precipitação do RNA total a 4°C *overnight*. Uma centrifugação a 8.000*g* por 30 min precipitou o RNA que foi ressuspenso em 1,8 mL de água e reprecipitado pela adição de 0,2 mL de acetato de sódio 2 M e 2 volumes de etanol 96% (v/v) gelado seguido de incubação a -20ºC *overnight*. Nova centrifugação a 8.000 *g* por 10 min e lavagem com etanol 70% foram realizadas e o RNA foi ressuspenso em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80°C até seu uso. A concentração do RNA foi estimada pela fórmula: [RNA] µg/µL = (A_{260} f 40/1000), onde f é o fator de diluição e 40 é o fator de conversão.

Eletroforese em gel de agarose desnaturante (contendo 0,6 M de formaldeído) a 1,8% (contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio) foi utilizada para verificar a integridade do RNA isolado. O tampão de corrida MOPS (0,02 M de MOPS, pH 7,0; 5 mM de acetato de sódio; 1 mM de EDTA, pH 8,0) foi utilizado para separar as bandas.

3.12. RT-PCR

3.12.1. Tratamento das amostras de RNA total com DNase

Antes de serem amplificadas, as amostras foram tratadas com "RQ_1 RNase-free DNase" (PROMEGA) conforme recomendações do fabricante. Um total de dez µg de cada amostra foram incubados em tampão da "RQ_1 RNase-free DNase" 1X (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; $MgSO_4$ 10 mM e $CaCl_2$ 1 mM) por 30 min, a 37°C, extraídas com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), reextraídas com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e precipitadas pela adição de acetato de sódio 3 M e etanol. O RNA foi incubado a -20°C por no mínimo 12 h e depois coletado por centrifugação a 12.000 *g* por 30 min. O precipitado foi lavado em etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água tratada com DEPC.

A quantificação foi feita em espectrofotômetro e a integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,8%, conforme descrito no item 3.11.

3.12.2. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o "SuperScript Kit Pre-amplification System for First Strand cDNA Synthesis" (INVITROGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Um total de três μg de cada amostra de RNA total tratado com RQ1 DNase I foram incubados com 0,5 μg de oligo $(dT)_{12-18}$ a 70°C por 10 min e, em seguida, as amostras foram incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras, tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), $MgCl_2$ 5 mM, dNTPs 0,5 mM cada e DTT (ditiotreitol) 5 mM, e foram incubadas a 42°C por 5 min. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima "SuperScript II RNase H^- Reverse Transcriptase" (INVITROGEN) e as amostras foram incubadas por mais 50 min a 42°C.

Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA do híbrido DNA/RNA foi degradado por incubação com 2 unidades de RNase H (INVITROGEN) a 37°C, por 20 min. Para cada reação de síntese da primeira fita foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes exceto a enzima transcriptase reversa.

3.12.3. Reações de amplificação por PCR

As reações de síntese da segunda fita e amplificação foram conduzidas no termociclador da APPLIED BIOSYSTEMS, modelo 9.600, com período inicial de desnaturação a 94°C por 1 min, seguido por 35 ciclos (94°C por 30 s; 56°C ou 59°C por 1 min; e 72°C por 2 min) e um período adicional de extensão a 72°C, por 7 min.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μL contendo 2,5 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase, 0,4 pM de cada *primer*, 1,0 μL da reação de síntese da primeira fita, tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM) e $MgCl_2$ 2,5 mM. Os *primers* utilizados no RT-PCR foram os mesmos empregados nas reações de sequenciamento, descritos na Tabela 1. Para cada par de *primers* foram otimizadas as condições da reação de PCR.

Nesta etapa foi feita uma reação controle usando os *primers* de actina 3 de soja, com a finalidade de verificar a contaminação com DNA genômico e normalizar as

concentrações de cDNA molde. Quando na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação, com os *primers* da actina 3, produz um fragmento de 520 pb, já na presença de cDNA observa-se um fragmento de 440 pb devido à remoção de um íntron de 80 pb situado entre os sítios de ligação dos *primers*.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos clones positivos

A fim de verificar a presença de seqüências similares à sonda A53-09 na biblioteca de cDNA de soja FT-Cristalina, foi realizado um *screening* nesta biblioteca, utilizando o fragmento de 1019 pb como sonda. As condições de hibridização foram ajustadas previamente para estabelecer a temperatura ideal para a hibridização e para as lavagens. A hibridização ocorre devido à justaposição de seqüências nucleotídicas do cDNA com a sonda sob condições específicas de temperatura e concentrações de sal. Assim, a sonda foi aquecida a 95°C para sua desnaturação, e incubada à temperatura de 50°C com membranas de náilon contendo placas de lise. As lavagens, realizadas com SSC 0,1X e SDS 0,1%, foram realizadas para retirar o excesso de sonda que não se ligou ao cDNA imobilizados na membrana.

A partir da análise de 5 x 10^5 placas de lise de fagos recombinantes, utilizados para o *screening* do banco de cDNA, três clones positivos foram obtidos e denominados A5309-47, A5309-71 e A5309-72.

A observação de nucleotídeos conservados dentro dos genes de resistência apresenta uma vantagem para o isolamento de seqüências similares em espécies que não possuam nenhum gene de resistência identificado. Os genes análogos à resistência (RGAs) exibem "microclusteres" no genoma e seu mapeamento pode ser utilizado como marcador para genes de resistência conhecidos (Kanazin et al., 1996).

Martins (2000), ao caracterizar molecularmente a sonda de RFLP A53-09, comparou a seqüência desta sonda a outras seqüências de genes *R* depositadas no *GenBank*. A comparação mostrou alta similaridade da sequência deste gene com a sequência de genes que codificam a proteína *Cf-9-1ike* de *Arabidopsis thaliana*,

proteína de resistência a doenças Cf-2/Cf-5 de *Hordeum vulgare* e outras proteínas de resistência de *Lycopersicon esculentum*. Assim, a escolha desta sonda para a realização do *screening* objetivou o isolamento de genes similares à resistência em soja.

RGAs têm sido identificadas em milho (Collins et al., 1998), *Arabidopsis* (Aarts et al., 1998), trigo (Spielmeyer et al., 1998), cevada (Leister et al., 1998), feijão (Rivikin et al., 1997) e melão (Garcia-Mas et al., 2001) e estão sendo utilizadas nas pesquisas que tentam elucidar os mecanismos de resistência a doenças em plantas (citados por Marcelino, 2002).

Depois de identificados e isolados, os clones positivos que hibridizaram com a sonda A53-09 foram capturados e armazenados em meio SM contendo clorofórmio e então, submetidos à excisão dos fagomídeos que continham o com identidade à sonda. O "cDNA Syntesis Kit", utilizado durante a construção da biblioteca de cDNA, possui o vetor Uni-Zap XR que permite a clonagem de fragmentos de 0 a 10 Kb dentro dos sítios de restrição das enzimas *Eco* RI e *Xho* I. Este vetor permite a excisão dos fagomídeos pBluescript, não necessitando das etapas de subclonagem, possibilitando trabalhar com o inserto da mesma maneira que se trabalha em um sistema plasmidial.

O DNA palsmidial dos clones A5309-47, A5309-71 e A5309-72 foi extraído e a liberação dos fragmentos de cDNA clonados foi feita pela clivagem com as enzimas *Eco* RI e *Xho* I, gerando fragmentos estimados de 2,0, 1,30 e 1,12 kb, respectivamente (Figura 3).

Todos os fragmentos de DNA dos clones obtidos da reação de restrição, foram seqüenciados em ambas as direções com os *primers* T3 e T7 que possuem sítios de ligação no vetor. Neste primeiro sequenciamento as seqüências completas dos clones não foram obtidas. Foram, então, desenhados *primers* internos, com auxílio do Programa Primer3 Input Program, tendo como molde as seqüências já determinadas. A seqüência de cada *primer* pode ser vista na Tabela 2 de Materiais e Métodos. Os fragmentos amplificados com os *primers* internos foram alinhados às outras seqüências de cada clone pelo programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.), possibilitando a obtenção das seqüências completas dos clones isolados.

A sequência completa de nucleotídeos de cada clone foi submetida a uma busca por similaridades com outras seqüências depositadas no *GenBank* por meio do programa BLASTX. Após análise de cada clone isolado, foi avaliada a relação de seqüências mais similares de genes presentes no *GenBank*, encontradas pelo programa, utilizando o valor E ("expectation value"), que representa a probabilidade de que a

sequência encontrada seja devida ao acaso, para indicar a significância de similaridade de seqüências encontradas para cada gene.

Foi feita também uma análise de possíveis domínios presentes nas proteínas codificadas pelos genes isolados, por meio da busca no banco de dados para domínios conservados, utilizando o programa Pfam do Sanger Center (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml).

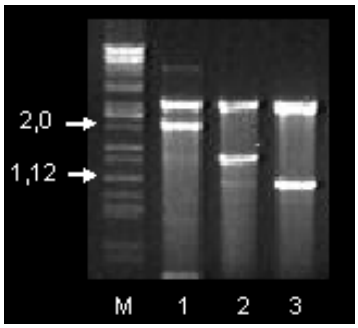

Figura 3 – Padrão de restrição dos clones isolados do banco de cDNA. Os clones 1: A5309-47, 2: A5309-71 e 3: A5309-72 foram clivados com as enzimas *Eco* RI e *Xho* I para liberação dos fragmentos de DNA clonados. Os números à esquerda indicam o tamanho das bandas em Kb. A letra M representa o marcador de tamanho λ *Hin*d III (DNA de fago λ digerido com *Eco* RI, *Bam* HI e *Hin*d III).

Clone A5309-47

O clone A5309-47 foi o único que não foi totalmente seqüenciado. Uma seqüência de 963 pb foi obtida utilizando o *primer* T3 e o *primer* interno, específico para o clone A5309-47 (Lox-F) e outra sequência de 961 pb foi obtida utilizando o *primer* T7 e o interno Lox-R, faltando apenas a sequência de aproximadamente 200 pb no meio da sequência do gene, para obtenção da sequência total do clone.

A sequência obtida do sequenciamento com os *primers* T3 e Lox-F foi utilizada para predizer as possíveis ORFs. Foi encontrada uma sequência de aminoácidos que codifica uma proteína putativa com 78 resíduos de aminoácidos. A putativa ORF presente no terceiro quadro de leitura da fita complementar pode ser observada na Figura 4. A comparação desta seqüência com as seqüências existentes no banco de dados revelou que este clone apresenta similaridade com as enzimas lipoxigenases (LOX) de *Glycine max* com 75% de identidade. As principais similaridades das seqüências de aminoácidos preditas para cada clone com as seqüências depositadas no banco de dados estão apresentadas na Tabela 3. A sequência obtida do sequenciamento

com os *primers* T7 e Lox-R também apresentou similaridade com as lipoxigenases de soja (dados não mostrados).

Lipoxigenases (LOX, E.C.1.13.11.12) são isoenzimas, que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados que contém a estrutura cis,cis-1,4-pentadieno para formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando moléculas reativas com atividades fisiológicas pronunciadas (Oliveira et al., 2002). As LOXs constituem uma grande família gênica de dioxigenases que contém ferro não-hêmico, são ubíquas em plantas superiores e podem estar envolvidas em diversos aspectos fisiológicos das plantas (Sanger et al., 2005). Em mamíferos, algumas LOXs estão envolvidas no metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos.

Em plantas, o aumento na expressão de lipoxigenases pode ser detectado durante ou após uma variedade de estresses, incluindo ataque por insetos (Hildebrand et al., 1989), infecção por patógenos (Melan et al., 1993), ferimento mecânico (Vieira et al., 2001) e em outros processos fisiológicos como: crescimento e desenvolvimento, senescência, armazenamento temporário de nitrogênio e biossíntese de moléculas regulatórias.

Uma degradação seqüencial de lipídeos pode ser iniciada pelas LOXs após uma injúria ou ataque de um patógeno. Isto leva à formação de produtos como: a traumatina, conhecida como hormônio do ferimento, envolvido na resposta a ferimentos; o ácido jasmônico, que está associado à ativação de genes que codificam para a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (Melan et al., 1993); os aldeídos voláteis e oxiácidos, que causam efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos e levam à indução da divisão celular e formação de calos (Gobel et al., 2001).

A atuação das LOXs ocorre pela "Via das Lipoxigenases". Esta via é responsável pela produção de importantes hormônios e metabólitos defensivos em plantas, algas e animais (Feussner e Wasternack, 2002) e envolve a ação das enzimas hidroperóxido liase (HPL), hidroperóxido ciclase, dehidrase e peroxidase sobre os hidroperóxidos, produzindo produtos oxigenados de cadeias mais curtas que podem atuar como inibidores do crescimento de fungos, insetos e protozoários (Senger et al., 2005).

Os metabólitos originados desta via são coletivamente denominados de oxilipinas, produtos oxidados cíclicos ou acíclicos derivados do catabolismo de ácidos graxos, capazes de regular muitas vias de defesa e de desenvolvimento em plantas (Creelman e Mulpuri, 2002). Diversos estudos têm relatado o aumento dos níveis de oxilipinas em folhas de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao ataque de patógenos

```
      W  D  A  I  Q  D  R  G  S  Q  E  L  R  F  S  L  S  Y  Q  I
-3    tgggatgctatccaagaccgggggtcccaggaattacgtttttctttgtcctaccaaatc  -62

      Q  D  A  P  P  *  R  S  P  *  T  P  K  P  A  G  K  N  C  R
-63   caggatgcaccaccttagagaagtccctgaactcccaagcctgctggaaagaactgtaga  -122

      G  G  S  W  K  T  R  K  M  K  P  W  W  P  K  D  C  K  L  V
-123  ggtgggtcatggaagacaagaaaaatgaagccatggtggcctaaagattgcaaactcgtg  -182

      K  S  *  L  K  L  A  L  S  S  Y  W  T  A  S  A  L  H  A  A
-183  aagagctagttgaagcttgcgctatcatcatattggactgcttcagcacttcatgcagct  -242

      V  N  F  G  Q  Y  P  Y  G  G  L  I  L  N  R  P  T  L  S  R
-243  gttaattttggacagtatccctatggaggtttaatcttaaaccgtccaactcttagtagg  -302

      R  F  M  P  E  K  G  S  A  E  Y  E  E  L  R  K  N  P  Q  K
-303  cgattcatgcctgagaaaggttctgctgagtatgaggagctgaggaagaatccccagaag  -362

      A  Y  L  K  T  I  T  P  K  F  Q  T  L  I  D  L  S  V  I  E
-363  gcttacttgaagactattacaccaaagtttcagacccttattgacctttctgttatagaa  -422

      I  L  S  R  H  A  S  D  E  V  Y  L  G  E  R  D  N  P  N  W
-423  atcttgtcaaggcatgcatctgatgaggtgtaccttggggagagggacaatccaaattgg  -482

      T  S  D  T  R  A  L  E  A  F  K  R  F  G  N  K  P  G  A  N
-483  acatctgatacaagagcgttagaggcttttaaaaggtttggaaataaacctggcgcaaat  -542

      ▲  E  *  T  L  R  E  K  Q  R  *  E  T  E  K  P  L  W  T  S
-543  tgagaataaactctcagagagaaacaacgatgagaaactgagaaaccgttgtggaccagt  -602

      S  N  A  L  Y  S  A  F  A  F  *  *  G  R  I  N  F  Q  R  N
-603  tcaaatgccttatactctgcttttgccttctagtaaggaaggattaactttcagaggaat  -662

      S  Q  Q  Y  L  Y  L  K  R  F  V  V  P  *  V  L  W  L  *  I
-663  tcccaacagtatctctatctgaagaggtttgtggttccttaagttttgtggctttgaata  -722

      K  D  R  R  E  G  I  *  I  S  S  S  N  L  H  M  V  I  *  C
-723  aaagatagaagagaaggaatctgaatttcttcatccaacctgcacatggtaatctagtgt  -782

      V  *  V  L  C  M  F  G  F  N  K  I  K  A  V  V  L  *  N  V
-783  gtttgagtgctttgcatgtttggctttaataaaataaaagcagttgttttgtaaaatgtt  -842

      Q  N  Q  *  K  H  L  L  L  C  F  V  R  *  K  K  S  R  R  G
-843  cagaatcaataaaagcatttactgctttgctttgtgcgctaaaaaaaaagtcgacgcggc  -902

      R  E  F  L  Q  P  G  G  C  H  *  L  L  E  R  Q  P  P  R  W
-903  cgcgaattcctgcagcccgggggatgccactagttgctagagcggcagcctccgcggtgg  -962

-963  a  -963
```

Figura 4 – Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos predita para o clone A5309-47. As letras minúsculas representam a seqüência de nucleotídeos e as letras maiúsculas representam a seqüência de aminoácidos predita. A potencial ORF está sublinhada, sendo seu início destacado com a letra M e o fim com um ▲. O domínio de lipoxigenase está indicado em negrito e itálico. Asteriscos no meio da sequência representam possíveis códons de parada.

(Schaller, 2001), ao ozônio (Rao et al., 2000), à luz ultravioleta (Conconi et al., 1996) e ao estresse osmótico (Kramel et al., 2000) (citados por Creelmam e Mulpuri, 2002).

A formação de hidroperóxidos derivados de ácidos graxos poliinsaturados representa o primeiro passo na síntese de oxilipinas. As LOXs de plantas atuam sobre seus substratos lipídicos e produzem hidroperóxidos octadecadienóico (HPOD) e octadecatrienóico (HPOT) que são alvos da enzima aleno óxido redutase (ASO), formando o ácido jasmônico, ou da enzima hidroperóxido liase, formando aldeídos.

Jasmonato e seu éster metil-jasmonato são os principais exemplos de oxilipinas. Estes compostos são ubíquos nas plantas e constituem os principais compostos sinalizadores em vários processos da planta. Os efeitos fisiológicos do ácido jasmônico sobre plantas de soja já foram evidenciados e compreendem: regulação da expressão de genes que codificam proteínas de reserva vegetativa, transdução de sinais relacionados a estresses, indução gênica de inibidores de proteases e o aumento dos níveis de transcritos e da atividade de lipoxigenases em plântulas e folhas de soja (Oliveira et al., 2002).

Alguns estudos sugerem que respostas mediadas por jasmonato são fortemente influenciadas por interação com outras vias de sinalização como, por exemplo, do ácido salicílico e do etileno. Há evidências na literatura de que, dependendo da espécie de planta e do estímulo que ela recebe, as vias podem atuar sinergisticamente ou antagonicamente (Xu et al., 1994). A relação antagonista entre as vias de sinalização por JA e AS é bem documentada em respostas a injúrias em plantas, sendo que o AS inibe a biossíntese de jasmonato, enquanto JA e etileno são requeridos para impedir o efeito inibitório do AS em vias dependentes do jasmonato (Creelman e Mulpuri, 2002).

Estudos com plantas transgênicas têm demonstrado a importância de LOXs e dos produtos da Via das lipoxigenases na resposta da planta ao ataque de patógenos. Plantas de *Arabidopsis* transgênicas que apresentam decréscimo nos níveis desta enzima não apresentam acúmulo de jasmonato e tornam-se mais suscetíveis ao ataque (Royo et al., 1999).

Aldeídos voláteis, produzidos pela "Via de Lipoxigenase", são importantes no processo de infecção por patógenos porque inibem o crescimento destes, atuando como compostos antimicrobianos. Segundo Croft et al. (1993), estes aldeídos são moléculas de seis carbonos, com o trans-2-hexanal, que é o componente característico do sabor e odor de frutos e folhas, além de outros compostos carbonílicos. Trabalhos realizados por Silva et al. (2001) verificaram a presença de níveis significativos de aldeídos totais em soja FT-Cristalina, quando induzidas por patógenos. Parâmetros bioquímicos e

cinéticos obtidos para as lipoxigenases da soja FT-Cristalina sugerem que uma resposta ao fungo *Diaphorte phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, que é o agente causador do cancro-da-haste, é mediada pela via das lipoxigenases e promove a proteção desta variedade contra o ataque deste patógeno (Silva et al., 2001).

Com o disposto acima, é possível propor que a ação do clone A5309-47, similar a lipoxigenases, pode estar envolvida na resposta de defesa a patógenos atuando como gerador de moléculas sinalizadoras como o ácido jasmônico, o metil jasmonato ou outros peróxidos lipídicos, que agem de maneira coordenada para amplificar o sinal de uma resposta específica. A atuação da putativa proteína codificada por este clone pode ocorrer tanto no sítio de infecção durante a morte celular, característica da resposta de hipersensibilidade, quanto nas outras partes da planta promovendo a sinalização para a resposta sistêmica. A ação desta enzima pode causar prejuízos na membrana plasmática de células infectadas para liberar precursores de moléculas sinalizadoras que vão ativar vias de sinalização mediadas por jasmonato conferindo resistência à planta.

Clone A5309-71

O clone A5309-71 foi totalmente seqüenciado. Ele contém 1587 pb e uma ORF que potencialmente codifica 306 resíduos de aminoácidos. A análise de similaridade entre a seqüência de aminoácidos predita para este clone com seqüências do *GenBank* revelou que há 63% de identidade com a proteína estearoil-acil dessaturase de *Arabidopsis thaliana* (Figura 5).

Lipídeos são importantes componentes de membranas biológicas. Muitas moléculas, denominadas "segundos mensageiros", são derivadas de lipídeos e participam dos mecanismos de transdução de sinais que influenciam o crescimento da planta, seu desenvolvimento e a resposta ao meio ambiente, inclusive a patógenos (Weber, 2002).

Síntese *de novo* dos ácidos graxos em plantas superiores ocorre em plastídeos e requer a síntese de proteínas carreadoras de acilas (ACP) que carream os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oléico (18:1). Os ácidos graxos são usados na síntese de glicerolipídeos, ou são exportados dos plastídeos para o citoplasma como coenzimas (CoA) e utilizados na síntese de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserina (PS), que são os fosfolipídeos predominantes nas membranas plasmáticas (Kachroo et al., 2004). A dessaturação de lipídeos ACP-ácido esteárico (18:0) e ACP-ácido oléico (18:1) é catalisada por uma estearoil acil

```
     P  A  P  L  P  Q  R  Y  R  *  A  *  Y  R  I  R  G  R  V  D
2    ccagcccctcttcctcaacggtatcgataagcttgatatcgaattcgcggccgcgtcgac  61
     K  A  H  H  R  H  L  L  P  P  L  N  A  A  V  S  A  A  P  F
62   aaagcccaccaccgccaccttcttccgccgttaaacgctgcggtttccgcggcgccgttc  121
     K  A  R  K  A  H  S  M  P  P  E  K  K  E  I  F  K  S  L  E
122  aaagcccggaaggcccactcaatgcctccagaaaagaaagaaattttcaagtccttggag  181
     G  W  A  S  E  W  V  L  P  L  L  K  P  V  E  Q  C  W  Q  P
182  ggatgggcctcggagtgggtcctaccgctgctgaagcccgtggagcaatgctggcagcca  241
     Q  N  F  L  P  D  P  S  L  P  H  E  E  F  S  H  Q  V  K  E
242  caaaacttcctccctgacccctcccttccgcatgaagagttcagccatcaggtgaaggag  301
     L  R  E  R  T  K  E  L  P  D  E  Y  F  V  V  L  V  G  D  M
302  cttcgcgaacgcactaaagagttacctgatgagtactttgtggtgctggtgggtgatatg  361
     V  T  E  D  A  L  P  T  Y  Q  T  M  I  N  N  L  D  G  V  K
362  gtcaccgaggacgcgcttcccacttaccagaccatgatcaacaaccttgatggagtgaaa  421
     D  D  S  G  T  S  P  S  P  W  A  V  W  T  R  A  W  T  A  E
422  gatgacagcggcacgagcccgagcccgtgggccgtgtggacccgggcctggaccgccgag  481
     E  N  R  H  G  D  L  L  R  T  Y  L  Y  L  S  G  R  V  D  M
482  gaaaacagacacggggatctgctcagaacttatttgtatctctctgggagggttgacatg  541
     A  K  V  E  K  T  V  H  Y  L  I  S  A  G  M  D  P  G  T  D
542  gctaaggtcgaaaagaccgtacattacctcatttcagctggcatggaccctgggacagac  601
     N  N  P  I  F  W  G  F  V  Y  T  S  F  Q  E  R  A  T  F  V
602  aacaaccccatattttgggggtttgtgtacacgtcattccaagagcgagcaacatttgtg  661
     A  H  G  N  T  A  R  L  A  K  E  G  G  D  P  V  L  A  R  L
662  gcgcacgggaacacggctcggctcgcgaaggagggcggggatccagtgctggcgcgccta  721
     C  G  T  I  A  A  D  E  K  R  H  E  N  A  Y  S  R  I  V  E
722  tgcgggaccatcgcagcggacgagaagcggcacgagaacgcgtactcaagaatcgtggag  781
     K  L  L  E  V  D  P  T  G  A  M  V  A  I  G  N  M  M  E  K
782  aagcttctggaagtggaccccaccggggcaatggtggccatagggaacatgatggagaag  841
     K  I  T  M  P  A  H  L  M  Y  D  G  D  D  P  R  L  F  E  H
842  aagatcacgatgccggcgcaccttatgtacgatggggatgaccccaggctattcgagcac  901
     Y  S  A  V  A  Q  R  I  G  V  Y  T  A  N  D  Y  A  D  I  L
902  tactccgctgtggcgcagcgcataggcgtgtacaccgccaacgactacgcagacatcttg  961
     E  F  L  V  E  R  W  R  L  E  K  L  E  G  L  M  A  E  G  K
962  gagtttctcgttgaacggtggagattggagaagcttgaaggattgatggctgaggggaag  1021
     R  A  Q  D  F  R  V  W  V  G  A  E  D  ▲  E  V  A  R  A  R
1022 cgggcgcaggatttccgtgtgtgggttggcgccgaggattaggaggttgcaagagcgcgc  1081
     *  *  R  A  R  K  M  K  K  H  H  G  V  K  F  S  W  I  F  N
1082 tgatgacgagcgcgtaagatgaagaagcatcatggcgttaagttcagttggattttcaat  1141
     K  E  L  L  L  *  N  F  Q  L  R  L  K  R  *  E  I  E  V  N
1142 aaagaattgcttttgtgaaatttccagttaagacttaagagataagagatagaggtcaac  1201
     V  S  Q  Q  V  F  G  F  V  T  I  L  S  L  C  L  *  V  A  F
1202 gtgagtcaacaggtttttggctttgtgactattttgagtctttgtttgtaggtggcattt  1261
     *  V  R  I  M  N  N  L  T  W  I  A  C  N  G  H  C  W  I  H
1262 tgagtacgaataatgaacaatttaacatggattgcgtgtaatggacattgttggatccat  1321
     G  C  C  S  G  G  Y  K  T  X  R  X  F  L  L  X  R  L  A  C
1322 ggttgttgttctggtggatacaaaaccmgtaggrctttttgttgkaacgtttggcttgc  1381
     I  L  A  *  L  V  S  V  S  L  Y  L  K  Y  H  I  L  *  *  N
1382 atattagcttagcttgttagtgtttctctttatttaaaatatcatattttgtaataaaat  1441
     L  C  I  R  *  *  Y  D  I  L  I  A  C  F  G  F  K  K  K  K
1442 ctctgtattaggtaatgatatgatatactaatagcatgttttggttttaaaaaaaaaaaa  1501
     K  K  K  K  K  S  T  A  A  A  N  F  L  S  V  P  G  D  A  X
1502 aaaaaaaaaaaaaagtcgaccgcggccgcgaatttcctgtcagtcccgggggatgccwct  1561
     S  S  R  X  X  T  S  A
1562 agttctagagykgnaacctccgcggt  1587
```

Figura 5 – Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos predita para o clone A5309-71. As letras minúsculas representam a seqüência de nucleotídeos e as letras maiúsculas representam a seqüência de aminoácidos predita. A potencial ORF está sublinhada, seu início marcado pela letra M e o fim por ▲. O domínio de dessaturase está indicado em negrito e itálico. Asteriscos no meio da seqüência representam possíveis códons de parada.

dessaturase específica (S-ACP-DES) e representa um dos passos chave na biossíntese de lipídeos porque promove a regulação dos níveis de ácidos graxos insaturados na célula (Kachroo et al., 2004).

As estearoil acil dessaturases são enzimas que catalisam a dessaturação de ácidos graxos saturados inserindo uma dupla ligação na posição delta. A atuação desta enzima promove aumento dos níveis de ácidos graxos poliinsaturados que são direcionados para a peroxidação lipídica para a formação de moléculas sinalizadoras que vão ativar a expressão de genes relacionados à defesa. Em *Arabidopsis*, a dessaturação de um ácido 16:0 a um hexadecatrienóico 16:3, ocorre em complexos lipídeos localizados em plastídios, mas o local da dessaturação de um lipídeo específico é determinado pela localização da enzima que é responsável por esta reação. Oxilipinas e ácido salicílico são algumas das moléculas resultantes destes processos.

Como mencionado anteriormente, a síntese de oxilipinas, ocorre a partir de ácidos graxos poliinsaturados derivados de membranas lipídicas. O jasmonato (JA) e seu éster metil (MeJA) são requeridos para o desenvolvimento do pólen (Stinzi e Browser, 2000) e para a expressão do gene *PDF1.2* da proteína defensina antifúngica (Penninckx et al., 1998). Já foi verificado que alta expressão do gene *PDF1.2* está correlacionada com o aumento da resistência ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* (Berrocal-Lobo et al., 2002).

O ácido salicílico (AS), importante molécula sinalizadora em plantas, influencia o desenvolvimento e as respostas de defesa. O AS apresenta um importante papel na resposta de defesa de plantas, pois favorece a "explosão" oxidativa que leva à morte celular durante a resposta de hipersensibilidade e ativa a resistência sistêmica adquirida (SAR), além de estar presente em diversas respostas da planta a condições adversas do ambiente. Na presença de patógenos é possível perceber níveis aumentados de AS nas plantas; esse aumento está relacionado com a ativação da expressão de genes envolvidos na patogênese (PR) e na resistência. Muitas PR possuem atividades antimicrobianas e sua expressão serve de marcador molecular para a ativação da resposta de defesa (Hammond-Kosack e Jones, 2003).

A importância das enzimas estearoil acil dessaturases na resposta de defesa está intimamente ligada à ativação de vias dependentes de JA e AS. A comprovação desta proposta tem sido validada por trabalhos com mutações duplas desenvolvidas em *Arabidopsis*. Uma mutação na proteína carreadora de acilas estearoil acil dessaturase (S-ACP-DES) inserida em mutantes *ssi* (supressor de insensibilidade ao AS) resulta em fenótipos caracterizados pelo acúmulo de AS e maior resistência, pois, expressam genes

de defesa mediados por AS, dependente e independente do gene *NPR1*, e reprimem a sinalização mediada por jasmonato (Nandi et al., 2003).

Mutantes *eds* (mutação *EDS* - aumento da suscetibilidade a doenças) de *Arabidopsis* apresentam síntese de AS bloqueada e diminuição na expressão de PR e, consequentemente, maior suscetibilidade a patógenos. O mesmo ocorre na superexpressão do gene *nahG* (salicilato hidroxilase, que degrada AS), que impede o acúmulo de AS, suprimindo a expressão de PRs e aumentando a suscetibilidade das plantas. A regulação dos genes *PRs* dependentes de AS em *Arabidopsis* é feita pelo gene *NPR1*, embora exista sinalização mediada por AS independente deste gene e mediada por JA (Nandi et al., 2004).

Kachroo et al. (2004), investigando a importância dos níveis de ácido oléico (18:1) e de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) na sinalização da defesa perceberam que mutações com perda de função no gene que codifica a 18:1ACP dessaturase podem restaurar o fenótipo dos mutantes *ssi*. A reversão desta mutação promove alteração dos níveis de ácido oléico resultando em ativação constitutiva de vias dependentes de AS e repressão de vias dependentes de JA, confirmando que a biossíntese de lipídeos poliinsaturados é importante regulador das vias de sinalização de defesa em plantas (Kanchroo et al., 2004).

Assim, o gene referente ao clone A5309-71, que é similar a uma estearoil acil dessaturase (S-ACP-DES), poderia estar atuando na regulação da biossíntese de lipídeos e na geração de segundos mensageiros que vão sinalizar a resposta de resistência a patógenos e promover a ativação de genes relacionados a esta resposta. A ação desse gene na defesa da planta pode estar relacionada também com a dessaturação de ácidos graxos favorecendo o aumento dos níveis de ácidos poliinsaturados e conseqüente liberação de compostos sinalizadores que levem à ativação de genes que codifiquem proteínas relacionadas à patogenicidade.

Clone A5309-72

O clone A5309-72 foi totalmente seqüenciado apresentando 1263 pb. Uma potencial ORF, que codifica 124 resíduos de aminoácidos, foi identificada no primeiro quadro de leitura (Figura 6). Quando comparadas a seqüência predita de aminoácidos e as seqüências do *GenBank*, o clone A5309-72 revelou identidade de 43% com uma peroxidase de *Glycine max*.

```
     R  X  G  X  R  R  P  S  S  S  D  G  I  D  K  P  C  I  S  N
1    cgaangggtnttcgacgcccctcttcctcrgacggtatcgataagccttgtatatcgaat  60
     S  R  P  R  R  Q  I  S  G  Y  I  X  D  H  Q  R  S  F  G  K
61   tcgcggccgcgtcgacaaatttcaggntacattgnagaccatcaaagaagctttggtaaa  120
     E  N  A  L  E  L  F  H  V  L  I  S  S  F  S  L  P  E  M  A
121  gagaatgccctggagttgtttcatgtgctgatatcctcgttctctctgccagagatggca  180
     L  F  R  *  E  V  P  I  S  L  L  R  L  E  E  G  M  V  E  G
181  ttgtttcgctaggaggtccccatatccctcttaagactggaagaagggatggtagaagga  240
     A  E  L  M  W  L  S  S  S  S  Q  T  T  M  S  P  F  X  Q  F
241  gcagagctgatgtggttgagcagttcctcccagaccacaatgagtccatttctbcagttc  300
     L  T  S  L  V  P  W  E  L  T  P  L  A  S  L  H  C  L  E  H
301  ttgacaagtttggtgccatgggaattgacacccctggcgtcgttgcactgcttggagcac  360
     T  V  L  V  E  P  I  V  *  S  W  C  T  V  C  T  Q  R  L  I
361  acagtgttggtcgaacccattgtgtgaagttggtgcaccgtttgtacccagagattgatc  420

     Q  L  *  T  L  T  T  S  L  T  F  *  R  S  A  L  M  P  F  Q
421  cagctctgaaccctgaccacgtccctcacattctgaagaagtgccctgatgccattccag  480

     T  L  R  R  C  S  T  C  R  N  D  R  G  T  P  M  I  L  D  N
481  accctaaggcggtgcagtacgtgtagaaacgaccgtggcactcccatgattctagacaac  540

     N  Y  Y  R  N  I  L  D  S  N  G  L  L  T  V  D  H  Q  L  A
541  aactactacagaaacatattagacagcargggtctcttgatwgtggatcaccaactagcc  600

     N  D  K  R  T  K  P  Y  V  K  K  L  A  K  S  Q  D  Y  F  F
601  aatgacaagaggaccaagccttatgtgaagaaaawggccaagagccaagactatttcttc  660

     K  E  F  S  R  A  I  T  L  L  S  E  N  N  P  L  T  G  T  K
661  aaggagttctctagagccattaccttgctctcagagaacaaccctctcactggcacaaag  720

     G  E  V  R  K  Q  C  N  V  A  N  K  H  N  G  S  G  P  L  N
721  ggtgaggtcagaaagcagtgcaatgttgccaacaagcaccmtggatcaggacccttgaat  780

     F  P  P  L  V  Y  D  R  G  R  K  K  V  I  Y  Y  A  P  L  N
781  tttcctcccctkgtctatgatcgaggaagaaaatmtgtaatatattatgcwrraawwaat  840

     ▲  G  L  F  L  *  M  G  W  F  N  E  P  R  P  Y  A  G  S  W
841  taaggkcttttcctttaaatgggstggttcaatgaaccragacccayngcaggttcwtgg  900
     G  X  E  X  *  X  A  M  F  F  N  L  P  M  L  L  L  F  F  F
901  ggakgggaggawtaaraggctatgtttttttaatcttccgatgttactgttgtttttttt  960
     *  F  Q  *  G  Y  Y  I  C  S  T  M  Q  V  A  *  S  W  V  E
961  taatttcaataaggatattatatatgtagtactatgcaagtagcttagagttgggtagaa  1020
     G  H  V  H  G  V  N  Y  X  X  Y  A  C  E  C  C  Y  D  G  S
1021 gggcatgttcatggtgttaattatsttakgtatgcgtgtgagtgctgttatgacggcagt  1080
     D  N  A  Y  D  I  S  X  S  *  S  *  V  V  L  S  K  *  I  N
1081 gacaatgcttatgatatttcatmctcataaagctaggttgttctttctaaataaataaat  1140
     H  G  P  W  A  L  L  H  C  *  K  K  K  K  S  R  R  G  R  E
1141 catggcccatgggcmttattacactgttaaaaaaaaaaaaaaaagtcgacgcggccgcgaa  1200
     F  L  A  C  P  G  D  P  L  V  L  E  X  X  P  A  A  V  E  S
1201 ttcctggcatgcccgggrgatccactagttctagagyggcancccgccgcggtggaatcc  1260
     S
1261 agc  1263
```

Figura 6 – Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos predita para o clone A5309-72. As letras minúsculas representam a seqüência de nucleotídeos e as letras maiúsculas representam a seqüência de aminoácidos predita. A potencial ORF está sublinhada, seu início marcado pela letra M e o fim por ▲. O domínio de peroxidase está indicado em negrito e itálico. Asteriscos no meio da sequência representam possíveis códons de parada. O X na sequência de aminoácidos representa o aminoácido que não pôde ser determinado porque o nucleotídeo correspondente não está definido no processo de sequencimento.

Peroxidases são enzimas que catalisam a dismutação do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. Durante este processo, vários intermediários reativos são formados, os radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) e os superóxidos (O_2^-) são alguns exemplos. Espécies reativas de oxigênio (ROS) é um termo comumente utilizado para classificar todos os radicais livres derivados do oxigênio. Radical livre é qualquer molécula que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica (Nordberg e Arner, 2001).

A produção de ROS é a primeira resposta detectada após contato com patógeno virulento ou avirulento. Uma fraca geração de ROS nos primeiros minutos após a infecção ocorre devido a uma reação não específica. Após algumas horas, uma segunda e mais expressiva produção de ROS, chamada de "burst" ou "explosão" oxidativa, ocorre em células infectadas por patógenos avirulentos. Esta cinética de duas fases é típica em interação incompatível planta-patógeno (De Gara et al., 2003).

Algumas dessas moléculas, como o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), são extremamente reativas. O radical superóxido (O_2^-), gerado a partir da adição de um elétron ao oxigênio molecular, é um radical livre pouco reativo, apresenta pouca habilidade para penetrar nas membranas celulares e, portanto fica preso no compartimento onde é produzido. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um metabólito, resultante do metabolismo do oxigênio, extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o $OH^{\bullet}$.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinal que apresenta baixa reatividade com a maioria das biomoléculas, mas reage facilmente com outros radicais livres (ex. radicais peroxil e alquil), gerando moléculas reativas. Este composto não é capaz de promover a morte do patógeno, mas inibe seu crescimento e potencializa a indução da morte celular mediada por ROS, pois é capaz de ligar-se à enzima catalase e inibir sua atividade, promovendo aumento dos níveis de H_2O_2 (Buchanan et al., 2000).

Várias vias para a geração de ROS têm sido propostas, mas estudos farmacológicos, imunológicos e moleculares dão suporte à idéia de que o sistema de geração de ROS em plantas é análogo à NADPH oxidase de membrana encontrada em mamíferos (Bowell, 1999). Similarmente ao que ocorre nos mamíferos, a NADPH oxidase das plantas transfere elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio extra-celular gerando superóxidos.

A presença simultânea de H_2O_2 e O_2, ou a reação de H_2O_2 com metais induzem a formação de radicais hidroxila, altamente deletérios para moléculas biológicas. Entretanto, H_2O_2 também impede a penetração de microrganismos nos tecidos da planta

porque contribui para o fortalecimento da parede celular por facilitar as reações das peroxidases na catálise de ligações cruzadas intra e inter estruturas moleculares da parede com a lignina polimerizada. Alguns dados sugerem que peroxidases secretórias são capazes de produzir uma "explosão" oxidativa sob condições geradas pelo ataque de patógenos (Bowell, 1999).

O aumento na produção de ROS causa danos a todos os tipos de moléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídeos (Storz e Imlay, 1999). Em relação aos lipídeos é comum a ocorrência da peroxidação lipídica, caracterizada pela deteorização de lipídeos poliinsaturados. A ação de ROS sobre a membrana plasmática, seguida de peroxidação, promove a perda da seletividade iônica, liberação de organelas e formação de produtos citotóxicos que culminam com a morte celular. Durante a resposta de defesa este processo é desencadeado a fim de criar um ambiente desfavorável para o desenvolvimento do patógeno e conter a colonização da célula (Nordberg e Arnér, 2001).

Estudos de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) indicam que os ácidos graxos são substratos utilizados pelas peroxidases para formar o H_2O_2, sugerindo que os fosfolipídios são requeridos para a geração de ROS. Sabe-se que fosfolipases estão envolvidos na ativação de NADPH oxidases. A fosfolipase D é importante nas mudanças de redox em células animais e um papel equivalente tem sido investigado para a "explosão" oxidativa nas plantas (Bowell, 1999).

A investigação da relação entre ROS e a indução de peroxidases têm mostrado que o superóxido (O_2^-) produzido em resposta ao elicitor fúngico induz a expressão de enzimas relacionadas à defesa, e em particular das enzimas peroxidases (Higa et al., 2001).

Embora uma das principais características da resposta de hipersensibilidade (HR) seja a formação de ROS, as plantas exibem um mecanismo de defesa antioxidante que evita que as outras células que não foram infectadas sejam preservadas dos danos causados pelas espécies ativas de oxigênio. Nos sistemas biológicos é importante manter um equilíbrio entre os níveis de O_2 e H_2O_2 e as enzimas que os destoxificam. Há evidências de que uma fina regulação do sistema antioxidante é parte das vias de sinalização que ativam as respostas de defesa (De Gara et al., 2003).

O sistema de defesa antioxidante utiliza enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSP) e aspartato peroxidase (ASC) para remover as espécies químicas reativas e proteger as plantas (De Gara et al., 2003). Atenção especial tem sido dada à glutationa (GSH). Foi comprovado que a diminuição

de GSH e aumento da sua forma oxidada, glutationa dissulfeto (GSSG), induz a acumulação de fitoalexinas, que são isoflavonóides com atividade antimicrobiana, e atuam em sinergia com outros sinais de ativação das estratégias de defesa induzidas por patógenos (De Gara et al., 2003).

Com base nestas considerações, a putativa proteína codificada pelo clone A5309-72, que apresenta similaridade a uma peroxidase, pode estar atuando no sentido de acentuar a produção de ROS durante a resposta de hipersensibilidade, fazendo parte da via de transdução de sinais que desencadeia a morte celular programada. Pode também estar envolvida na resposta de defesa mediada por fitoalexinas e na síntese da parede celular reforçando a barreira mecânica que impede a penetração do patógeno.

Tabela 3 – Similaridade entre seqüências de aminoácidos preditas para os clones A5309-47, A5309-71 e A5309-72 e as seqüências depositadas no *GenBank*.

Clone	Clone do *GenBank*	Acesso no *GenBank*	Espécie	Valor E	Similaridade (%)
A5309-47	Lipoxigenase	CAA 97845.1	*Vicia faba*	$1e^{-44}$	83
	Lipoxigenase	AAB 67732.1	*Glycine max*	$5e^{-37}$	75
	Lipoxigenase	CAA 53730.1	*Pisum sativum*	$3e^{-35}$	72
A5309-71	Estearoil acil dessaturase	AAD 28287.1	*Lupinus luteus*	$1e^{-77}$	65
	Estearoil acil dessaturase putativa	AAF 631000.1	*Arabidopsis thaliana*	$1e^{-73}$	63
	Estearoil-acil dessaturase	NP_ 175048.	*Arabidopsis thaliana*	$1e^{-73}$	63
A5309-72	Peroxidase	AAA 99868.1	*Cotton*	$3e^{-35}$	92
	Peroxidase putativa	BAC 84057.1	*Oryza sativa*	$3e^{-20}$	62
	Peroxidase	AAD 37374.1	*Glycine max*	$1e^{-24}$	43

4.2. Alinhamento dos clones isolados com a sonda A53-09

O alinhamento entre as seqüências nucleotídicas dos clones A5309-47, A5309-71 e A5309-72 com a sonda A53-09 pode ser observado nas Figuras 7, 8 e 9. A similaridade encontrada entre os clones e a sonda A53-09 variou de 41 a 45% de identidade de nucleotídeos.

A seqüência de aminoácidos predita para a sonda A53-09 contém uma ORF de 159 resíduos de aminoácidos e apresenta um domínio transmembrana e dois domínios LRR (repetição rica em leucina). LRRs são motivos de curtas seqüências presentes em um grande número de proteínas com diversas funções e localização celular. Estas repetições estão envolvidas com a interação proteína-proteína e são frequentemente flanqueadas por domínios ricos em cisteína.

A morfologia dos domínios LRRs indica que eles podem ter um papel crucial na formação do citoesqueleto da célula, fornecendo uma estrutura versátil para a interação entre proteínas. Estudos com estrutura 3D de complexos LRRs-ligantes identificaram que a superfície côncava desses domínios, que é formado por uma folha ß e uma volta, é ideal para a interação das proteínas.

Nenhum dos clones isolados apresentou um domínio LRR em sua estrutura. A maior ORF predita para cada clone, quando submetida à análise de predição de domínios protéicos pelos programas Pfam (Sanger Center) e TMA (WorkBench) (Materiais e Métodos), também não demonstrou a existência de domínio transmembrana para nenhum dos clones. Quanto ao domínio contido na maior ORF, o clone A5309-47 apresentou similaridade a um domínio de lipoxigenase, o A5309-71 a um domínio de dessaturase e o clone A5309-72 a um domínio de peroxidase.

Os domínios de lipoxigenase caracterizam as enzimas responsáveis em catalisar a hidroperoxidação de lipídeos. Elas contêm um átomo de ferro, ligado a quatro resíduos, três dos quais são de histidina. As plantas expressam uma variedade de lipoxigenases citoplasmáticas que atuam em diferentes situações fisiológicas da célula.

Os domínios de dessaturase caracterizam as enzimas ácidos graxos dessaturases catalisam a inserção de duplas ligações na posição delta de ácidos graxos. Existem duas famílias distintas de ácido graxo dessaturases: as estearoil-CoA dessaturase e as proteínas carreadoras estearoil-acil dessaturase encontradas em plantas. A esta última família, pertencem as enzimas que catalisam a inserção de uma dupla ligação na posição delta 9 da estearoil-ACP para produzir oleoil-ACP; estas enzimas são responsáveis pela conversão de ácidos graxos saturados em ácidos graxos insaturados durante a síntese de óleo vegetal.

Já o domínio de peroxidase caracteriza as enzimas que promovem a remoção dos peróxidos de hidrogênio da célula, convertendo-os a oxigênio e água. As peroxidases possuem duas famílias, uma encontrada em mamíferos e outra encontrada em bactérias, fungos e plantas. As peroxidases de plantas podem ser divididas em três classes. Na classe I estão as peroxidases intracelulares, que inclui a peroxidase citocromo *c* (CCP)

(enzima solúvel encontrada na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial), a ascorbato peroxidase (AP) (principal enzima de remoção de peróxidos do cloroplasto de plantas superiores) e a peroxidase-catalase (exibe atividade de catalase e peroxidase atuando no estresse oxidativo). Na classe II estão as peroxidases secretórias de fungos, ligninases, lignina peroxidases e peroxidases dependentes de manganês que são responsáveis pela degradação de ligninas. Na classe III estão as peroxidases secretórias de plantas que são glicoproteínas que apresentam várias funções tecido-específica como remoção de peróxido de hidrogênio do cloroplasto e citosol, oxidação de compostos tóxicos, resposta de defesa, biossíntese de parede celular, catabolismo de ácido acético e biossíntese de etileno.

Marcelino (2002), utilizando um fragmento de 295 pb derivado da sonda A53-09 utilizada neste trabalho, conseguiu isolar clones que apresentavam domínios de meristoilação e sítios de fosforilação por cinases. As proteínas meristioladas possuem radical meristato (ácido graxo de 14 carbonos) que reage covalentemente ao N-terminal da proteína e promove a interação da proteína com a membrana plasmática ou outras proteínas. A presença de sítios e domínios similares nas seqüências preditas de aminoácidos dos clones positivos e da sonda pode indicar a presença de regiões homólogas importantes entre as seqüências de DNA, bem como similaridades estrutural e funcional da proteína justifcando o isolamento dos clones.

As seqüências preditas para os clones isolados neste trabalho não apresentam nenhuma similaridade de domínios com o domínio encontrado na seqüência predita para a sonda A53-09 que permita afirmar que estes genes possuem domínios característicos de proteínas codificadas por genes de resistência, como por exemplo, os domínios LRRs. O isolamento dos clones positivos ocorreu unicamente por pareamento de bases específicas presentes nas duas seqüências, devido às condições específicas de hibridização.

Apesar de não encontrarmos domínios característicos de genes de resistência presentes nas putativas ORFs dos clones positivos todos os clones isolados apresentaram ORFs que potencialmente codificam enzimas chave para a ativação de várias respostas de defesa. A ativação do mecanismo de defesa altera todo o metabolismo da planta, e esta alteração é necessária para que ocorra uma eficaz proteção contra os patógenos. Sendo assim, todos os clones positivos obtidos neste trabalho, hibridizados à sonda A53-09 não correspondem a genes de resistência, mas estão, muito provavelmente, envolvidos na resposta de defesa da planta.

```
A5309-47        ------GACGGCTGGATTCCACCGCGGAGGT---TGCCGCTCTAGCAACTAGTGGCATCY
Sonda_A53-09    GCAGGGAGTAAAGGGGTTGCAGGAAGAAAAAGCATGAGACCCATGCAGCTGGTATAATCG
                             ** ** **    * *      **   * *  *** ** **   ***

A5309-47        CCCGGGCTGCAGGAATT-CGCGGCCGCGTCGACTTTTTTTTAGCGCACAAAGCAAAGCA
Sonda A53-09    TGAAGGAAGATATCATCGTGCTTTCTAGAAGATATGTAGGTAGTGGAATAAGGGAATATG
                    **  *     **   **   *  *  **  * *   *    * * ** * **

A5309-47        GT-----AAATGCTTTTATTGATTCTGAACATTTTACAAA-ACAACTGCTTTTATTTTAT
Sonda A53-09    GTTGTTAGGATATTCCATTTTATCTTTTCTGTTTTGCTTGTGGGGCCTTGTTCCCTGCAT
                **       **  *    ** **  *     **** *        *    **   *  **

A5309-47        TAAAGCCAAACATGCAAAGCACTCAAACACACTAGATTACC----ATGT----GCAGGTT
Sonda A53-09    AACAGCTATATATGTAGATGAATTAAGCGCTTTTGATATCAGAAAATATAACAGCAAGTT
                 * *** * * *** * *  * * ** * *  * ***  *     ** *    *** ***

A5309-47        GGATGAAGAAATTCAGATTCCTTCTCTTCTATCTTTTATTCAAAGCCACAAAACTTAAGG
Sonda A53-09    CTCCCTTAGTCTCTCTCTTCCTCTTCTTCTATGGAGGTTCCTAGCCCTCGAAACTAGGTG
                           *     *****  ********      * * *  ** * *****    *

A5309-47        AACCACAAACCTC--TTCAGATAGAGATACTGTTGGGAATTCCTCTGAAAGTTAATCCTT
Sonda A53-09    GTTCACGTTCTCAAGCTTGGTTCCTAACA-TGTGGTTAGACACTTTTAATCCTGAATGTC
                   ***   *      *  * *    * * *** *  *    ** * **   * *   *

A5309-47        CCTTACTAGAAGGCAAAAGCAGAGTATAAG---GCATTT-GAACTGGTCCACAACGGTTT
Sonda A53-09    TCCTTGTAGACATATATACCTCTACATATGTGTGCATTTTGCAACCACCACCATTAGTGG
                 * *  ****     * * *     *** *   ****** * *     *  **   **

A5309-47        CTSASKYKCTCMWMGKTGYTYYTCYCWGRAGCAGTTTATTCTCAATTTGYGCCAGSTTTA
Sonda A53-09    AATAAAATTTTAAATGCAAACCCTTCTATGGTA-TATATCCTATATAGGCATTG---TTA
                   *     *               *    * * * *** **  **  *        ***

A5309-47        TTTCCAAACCTTTTTAAAAGCCTCTAACGCTCTTGTATCAGA-TGTCYAATTTGGATTGT
Sonda A53-09    GTAGTAAATACCAACCGTGAACCAGAAAATTGTGGATTCAACCTTTTTCGTTTTCCTTCT
                 *   ***             *   **   * * *  ***   * *    ***   ** *

A5309-47        CCCTCTCCCCAAGG-TACACCTCA-TCAGATGCATGCCTTGGACAAGATTTCTATAACAG
Sonda A53-09    TCTTCATGGCAGTGCTATATGCAACTCATGTTCTTCTCTTGATATTGTCCACTGCAACAA
                 * **    **  * ** *    * ***  * * *  ****     *    **  ****

A5309-47        AA----AGGTCAATAAGGGTCTGAAACTTTGGTGTAATA-GYCTTCAAGTAAGCCTTCTG
Sonda A53-09    CTCTCCACTTCAGTGCAAGCAAGGCAGCAAGGCTCAATATGACTTGCAGCGAGAAGGAAA
                       *  *** *    *   *  *    **   **** * ***  **  **

A5309-47        GGGATTC-TTCCTCAGCTCCTCATAC---TCAGCAGAACCTTTCT-CAGGCATGAATCGC
Sonda A53-09    GGAATGCACTCCTCAGCTTCAAGCATGGACTAGCAGACCCTTCAAACAGGCTTTCATCGT
                ** ** *  ********* *    *      ****** ****    ***** *  ****

A5309-47        CTACTAA-GAGTTGGACGGTT---TAAGATTAAACCTCCATAGGGATACTGTCCCAAAAT
Sonda A53-09    GGTCTGACAAATCGGATTGCTGTACATGGCCAGGGGTTCACTGCAACAACACAGGTAAAG
                   ** *  * * ***  * *    * *   *    * **  *  * *        ***

A5309-47        TAACAGCTGCCM----TGAAAGKGCTGTAAGCAGYCCACTTATGGATGGATAGCGCAAGC
Sonda A53-09    TCATGGAAATCAATCTTGACACACCTGCGGGC--TCTCCCTATAGGGAGTTGAGTGGAGA
                * *  *    *     *** *   ***   **   *  * *** *   * *      **

A5309-47        TTCAACTAGCTCTTTTCACGGAGTTTTGCMCTCTTTAAGGGCCACCATGGGSGTCCAATT
Sonda A53-09    GATTAGTCCTTCTTTGCTTGAA--CTAAAATATTTGAATCGTTTGGACTTGAGTTCAAAT
                    * *   ***** *  * *   *       ** **  *     *   * ** *** *

A5309-47        TTTTCTTGKGCTCCATGGGACCCCACCTCCTACAGTAATCTTTCCAGCAGGCTTGGGAGT
Sonda A53-09    TATTTTGTTCTTACTCCAATACCAAGCTTCC----TAGGCTCATTGGAGAGTCTGAGATA
                * ** *     * *       ** * ** *     **  **     *   *  ** **

A5309-47        TCAGGRWCTTCTCTAAGGTGGTGCATCCTGGATTTGGTAGGACAAAGAAAAACGTAATTC
Sonda A53-09    CTTGGACCTTAGCTTAAGTGGG--TTCATGGGATTAATCCCTCATC-AACTAGGAAACCT
                   **  ***  ** * ****    ** ***  **  *    **   **  * * **

A5309-47        CTGGGACCCMYTGGTCTTGGATAGCATCCCATA
Sonda A53-09    CTCAAACCTGCAG--------------------
                **   ***    *
```

Figura 7 – Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do clone A5309-47 e a sonda A53-09. As posições de identidade estão destacadas em azul. Em negrito e sublinhados estão os domínios transmembrans e LRR encontrados na sonda A53-09. (*) representa nucleotídeos conservados, (-) representa nucleotídeos sem consenso, estes gaps são utilizados para maximizar o anelamento.

```
Sonda A53-09      ------------------------------------------GCAGGGAGTAAAGGGGTT
A5309-71          TGCTATTAGTATATCATATCATTACCTAATACMGAGATTTTATTACAAAATATGATATTT
                                                            *   * **      **

Sonda A53-09      GCAGGAAGAAAAAGCATGAGACCCATGCAGCTGGTATAATCGTGAAGGAAGATATCATCG
A5309-71          TAAATAAAGAGAAACACTA-ACAAGCTAAGCTAATATGCAAGCCAAACGTTMCAACAA-A
                    *  **  * ** **  * **      ****  ***    *  **       * **

Sonda A53-09      TGCTTTCTAGAAGATATGTAGGTAGTGGAATAAGGGAATATGGTTGTTAGGATATTCCAT
A5309-71          AAAGYCCTACKGGTTTTGTATCCMCCAGAACAACA-ACCATGGATCCAACAATGT-CCAT
                        ***   * * ****       *** **   *  **** *   *  ** * ****

Sonda A53-09      TTTATCTTTTCTGTTTTGC-TTGTGGGGCCTT-GTTCCCTGCATAACAGCTATATATGTA
A5309-71          TACACGCAATCCATGTTAAATTGTTCATTATTCGTACTCAAAATGCCACCTACAAACAAA
                  *  *     **  * **   ****      ** ** * *   **  ** *** * *   *

Sonda A53-09      GATGAATTAAGCGCTTTTGATATCAGAAAA-TATAACAGCAAGTTCTCCCTTAGTCTCTC
A5309-71          GACTCA--AAATAGTCACAAAGCCAAAAACCTGTTGACTCACGTTGACCTCTATCTCTTA
                  **   *  **    *    *   ** ***  * *     ** ***  **  **     *

Sonda A53-09      TCTTCCTCTTCTTCTATGGAGGTTCCTAGCCCTCGAAACTAGGTGGTTCACGTTCTCAAG
A5309-71          TCTCTYAAGTCTTAACTGRAAATTTCACAAAAGCAATTCTTTATTGAAAATCCAACTGAA
                  ***      ****   ** *  ** *       * *  **   * *   *        *

Sonda A53-09      CTTGGTTCC-TAACATGTGGTTAG---ACACTTTTAATCCTGAATGTCTCCTTGTAGACA
A5309-71          CTTAACGCCATGATGCTTCTTCATCTTACGCGCTCRCTCATCAGCGCGCTCTTGCAACCC
                  ***    ** * *    *  * *    ** *  *   ** * *  *    **** *  *

Sonda A53-09      TA-TATACCTCTA---------CATATGTGTGCATTTTGCAACCACC---------ACCA
A5309-71          TCCTAAATCCTCGGCGCCAACCCACACACGGAAATCCTGCGCCCGCTTCCCCTTCARCCA
                  *  ** * *             ** *   *   **  ***  ** *           ***

Sonda A53-09      TTAGTGGAATAAAATTTTA--AATGCAAACCCTTCTATGGTATATATC-------CTATA
A5309-71          TCAATCCCTTCAAGCTTCTCCAATCTCCACCGTTCAACGAGAAACTCCAAGATGTCTGCG
                  * * *    * **  **    ***    *** *** * *  * *   *       **

Sonda A53-09      TAGGCATTGTTAGTAGTAAATACCAACCGTGAACCAGAAAATTGTGGATTCAACCTTTTT
A5309-71          TAGTCGTTGGCGGT-GTACACGCCTATGGCGCTGCGCCACAGCG-GAGTAGTGCTCGAAT
                  *** * ***   ** *** *  ** *  * *   *   * *  * *  *    *     *

Sonda A53-09      CGTTTTCCTTCTTCTTCATGGCA-GTGCTATATGCAAC--TCATGTTCTTCT-CTTGATA
A5309-71          AGCCTGGGGTCATCCCCATCGTACATAAGGTGCGCCGGCATCGTGATCTTCTTCTCCATC
                   *  *    ** **  *** * *  *    *  **     ** ** ****** **  **

Sonda A53-09      TTGTCCACTGCAACAACTCTCCACTTCAGTGCAAGCAAGG-CAGCAAGGCTCAATATGAC
A5309-71          ATGTTCCCTATGGCCACCATT-GCCCCGGTGGGGTCCACTTCCAGAAGCTTCTCCACGAT
                   *** * **    * **  *   *  * ***    * *   *   ***  **   * **

Sonda A53-09      TTGCAGCGAGAAGGAAAGGAATGCACTCCTCAGCTTCAAGCATGGACTAGCA--GACCCT
A5309-71          TCTTGAGTACGCGTTACTCGTGCCGCTTCTCGTCCGCTGCGATGGTCCCGCATAGGCGCG
                  *       *   *  *       * ** ***  *  *    **** *  ***  * * *

Sonda A53-09      TCAAACAGGCTTTCATCGTGGTC--TGACAAATCGGATTGCTGTACATGGCCAGGGGTTC
A5309-71          CCAGCACTGGATGCCCCGCCCTCCTTCGCGAGCCGAGCCG-TGTTCCCGGTGCGCCACAA
                   **     *  * *  **   **  *  * *  **    * *** *  **   *

Sonda A53-09      AC-TGCAACAACACAGGTAAAGTCATGGAAATCAATCTTGACACAC----CTGCGGGCTC
A5309-71          ATGTTTGCTCGCTCTTGGAATGACGTGTACACAAACCCCAAAATATGGGGTTGTTGTCTG
                  *  *       * *  * ** * * ** * *  ** *   * * *      **  * **

Sonda A53-09      TCCCTATA-----GGGAGTTGAGTGGAGAGATTAGTCCTTCTTTGCTTGAACTAAAATAT
A5309-71          TCCCAGGGTCCATGCCAGCTGAAATGARGTAATGTAYGGWMTTT--TCGACCTTAGCCAT
                  ****         *  ** ***   **   * *        ***  * ** ** *   **

Sonda A53-09      TTGAATCGTTTGGACTTGAGTTCAAATTA-TTTTGTTCTTACTCCAATACCAAGCTTCCT
A5309-71          GTCAACCCTCCCCAGAGAGATACAAATAAGTTCTGAGCAGATCCCCGTGTCTGTTTTCCT
                   * ** * *    *      * ***** * ** **  *  *  **  *  *    *****

Sonda A53-09      AGGCTCATTGGAGAGTCTGAGATACTTGGACCTTAGCTTAAGTGGGTTCATGGGATTA--
A5309-71          CGGC--GGTCCAGGCCCGGGTCCACACGGCCCACGGGCT---CGGGCTCGTGCCGCTGTC
                   ***    *  **   * *    **  ** **   *  *    *** ** **    *

Sonda A53-09      ATCCCTCAT--CAACTAGGAAACCTCTCA-AACCTGCAG--------------------
A5309-71          ATCTTTCACTCCATCAAGGTTGTTGATCATGGTCTGGTAAGTGGGAAGCGCGTCCTCGGT
                  ***  ***   ** * ***       ***    ***
```

Figura 8 – Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do clone A5309-71 e a sonda A53-09. As posições de identidade estão destacadas em azul. Em negrito e sublinhados estão os domínios transmembrans e LRR encontrados na sonda A53-09. (*) representa nucleotídeos conservados, (-) representa nucleotídeos sem consenso, estes gaps são utilizados para maximizar o anelamento.

```
A5309-72        GCTGGATTCCACCGCGGCGGGTTGCCRCTCTAGAACTAGTGGATCYCCCGGGCATGCCAG
Sonda A53-09    ------------------------------------------------------------

A5309-72        GAATTCGCGGCCGCGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTAACAGTGTAATAAKGCCCATGGGCC
Sonda A53-09    ----------------------------------GCAGGGAGTAAAGGGGTTGCAGGAAG
                                                   *  * ****    *     **

A5309-72        ATGATTTATTTATTTAGAAAGAACAACCTAGCTT-TATGAGKATGAAATATCATAAGCAT
Sonda A53-09    AAAAAGCAT---------GAGACCCATGCAGCTGGTATAATCGTGAAGGA----AGATAT
                *  *   **          *** * *   ****  *** *   ****  *    *   **

A5309-72        TGTCACTGCCGTCATAACAGCACTCACACGCATACMTAASATAAT-TAACACCATGAACA
Sonda A53-09    CATCG-TGCTTTCTAGAAGATATGTAGGTAGTGGAATAAGGGAATATGGTTGTTAGGATA
                  **  ***  **   *    *   *          ***   *** *        * * *

A5309-72        TGCCCTTCTACCCAACTCTAAGCTACTTGCATAG---TACTACATATATAATATCCTTAT
Sonda A53-09    TTCCATTTTATCTT-TTCTGTTTTGCTTGTGGGGCCTTGTTCCCTGCATAACAGCTATAT
                * ** ** ** *    ***    * ****    *   *  * * *  **** * *  ***

A5309-72        TGAAATTAAAAAAAAAACAACAGTAACATCGGAAGATTAAAAAACATAGCCTY--TTAAT
Sonda A53-09    ATGTAG-ATGAATTAAGCGCTTTTGATATCAGAAAATATAACAGCAAGTTCTCCCTTAGT
                    *  *  **  ** *     * * *** *** **  ** * **    **   *** *

A5309-72        TCCTCCCMTCCCMATGAACCTGCAGKGGKCTCGGTTCATTGAACCMGCCCMTTTAAAGGA
Sonda A53-09    CTCTCTCTTCCTCTTCTTCTATGGAGGTTCCTAGCCCTCGAAACTAGGTGGTTCAC----
                  *** * ***   *   *       *  *   *  *    ***  *    ** *

A5309-72        AAAGMCCTTAATTWWTTYYWGCATAATATA-TTACAKATTTTCTTCCTCGATTCATAGAC
Sonda A53-09    ---GTTCTCAAGCTTGGTTCCTAACATGTGGTTAGACACTTTTAATCCTGAAT-GTCTCC
                   *  ** **           *  ** *  *** * * ***    *  ** *  *   *

A5309-72        MAGGGGAGGAAAATTCCAAGGGTCCTGGATCCAKGGTGCTTGKTGGCAACATTGCACTGC
Sonda A53-09    TTGTAGACATATATACC------TCTACATATGTG-TGCATTTTGCAACCAC--CACCA-
                  *  **   * ** **       **  **    * *** *  **  * **   ***

A5309-72        TTTCTGGACCTCACCCTTTGTTGCCCAG--TGAGGAGGGTTGTTCTCTGGAGAGCCAAGG
Sonda A53-09    TTAGTGGAATAAAATTTTAAATGCAAACCCTTCTATGGTATATATCCTATATAGGCATTG
                **  ****    *   **   ***  *   *     **  * *   **  * ** **  *

A5309-72        TAATGGGGCTCTTAGAAGAAAACTCCTTGGAAAGAAATAGTACCTTGGGCTCCTTTGGGC
Sonda A53-09    TTAGTAG-----TAAATACCAACCGTGAACCAGAAAATTGTGGATTCAAC-CTTTTTCGT
                * *   *     ** *    ***        *  **** **   **   * * ***  *

A5309-72        CATTTTCTTTTTTCACATTAAAAGGCTTTGGTCCTCTTGTCATTGGCTAGTTGGTGATCC
Sonda A53-09    TTTCCTTCTTCTTCATGGCAGTGCTATATGCAACTCATGTTCTTCTCTTGATATTG-TCC
                  *  *  ** ****    *      * **   *** ***  **  ** * *  ** ***

A5309-72        ACTAATCAAGGAGAACCCYTGCTGTTCTTAAAATATGTTTCTGTAGTAGTTGTTGTCTAG
Sonda A53-09    ACTG--CAACAAC--TCTCCACTTCAGTGCAAGCAAG--GCAGCAAGGCTCAATATGACT
                ***   ***  *    *    **    *  **  * *   * * *    *   * *

A5309-72        AATCATGGGAGTGCCACGGTCGTTTCTACACGTACTGCACCGCCTTAGGGTCTGGAATGG
Sonda A53-09    TGCAGCGAGAAGGAAAGGA----------ATGCACTCCTCAGCTTCAAG-CATGGACTAG
                      * **  *  * *           * * *** * * ** * * *   **** * *

A5309-72        CATCAGGGCACTTCTTTCAGAATGTGAGGGRACGTGGTCAGGGTTCAGAGCTGGATCAAT
Sonda A53-09    CA----GACCCTTCAAACAGGCTTTCA----TCGTGGTCTGA----CAAATCGGATTGCT
                **    * * ****   ***  * * *     ******* *       *   ****   *

A5309-72        CTCTGGGTACAAACGGTGCAC--CAACTTCACACAATGGGTTACGACCAACACTGTGTGC
Sonda A53-09    GTACATG-GCCAGGGGTTCACTGCAACAACACAGGTAAAGTCATGGAAATCAATCTTGAC
                 *    *  * *  *** ***  ****  ****      ** * *   * ** * *   *

A5309-72        TGCCAAGCAGTGCACACGACGCCAGGGGGTGTCAATTCCCATGGCACCAAACTTGTCAAG
Sonda A53-09    ACACCTGCGG-GCTCTCCCTATAGGGAGTTGAGTGGAGAGATTAGTCCTTCTTTG-CTTG
                   *  ** * ** * *       ** * **         **    **    *** *  *

A5309-72        AACTGVAGAAATGGACTCATTGTGGTCTGGGGAGGAACTGCTCAACCACATCAGCTCTGC
Sonda A53-09    AACTAAAATATTTGAATCGTTTGGACTTGAGTTCAAATTATTT------------TGTTC
                ****  *  * * ** ** **  *   ** *    ** *  *            * * *

A5309-72        TCCTTCTACCATCCCTTCTTCCAGTCTTAAGAGGGATATGGGGACCTCCTAGCGAAACAA
Sonda A53-09    TTACTCCAATACCAAGCTTCCTAGGCTCATTGGAGAGTCTGAGATACTT----GGACCTT
                *   ** *  * *     * * ** ** *   * **    * **         * * *

A5309-72        TGCCATCTCTGGCAGAGAGAACGAGGATATCAGCACATGAAACAACTCCAGGGCATTCTC
Sonda A53-09    AGCTTAAGTGGGTTCATGGGATTAATCCCTCATCAACTAGGAAACCTCTCAAACCTGCAG
                 **       **   *  * *  *     *** **  *   * * ***     * * *

A5309-72        TTTACCAAAGCTTCTTTGATGGTCTCAATGTACCTGAAATTTGTCGACGCGGCCGCGAAT
Sonda A53-09    ------------------------------------------------------------

A5309-72        TCGATATACAAGGCTTATCGATACCGTCYGAGGAAGAGGGGCGTCGAAAACCCTTTCG
Sonda A53-09    ----------------------------------------------------------
```

Figura 9 – Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do clone A5309-72 e a sonda A53-09. As posições de identidade estão destacadas em azul. Em negrito e sublinhados estão os domínios transmembrans e LRR encontrados na sonda A53-09.(*) representa nucleotídeos conservados, (-) representa nucleotídeos sem consenso, estes gaps são utilizados para maximizar o anelamento.

4.3. Análise da expressão do clone A5309-72

A técnica de RT-PCR foi utilizada a fim de verificar se o clone isolado A5309-72 continha seqüências expressas nas variedades de soja FT-Cristalina e Bossier (resistente e suscetível), e se essa expressão era influenciada pela infecção com o patógeno *Cercospora sojina*. O RT-PCR permite análise relativa da expressão gênica durante a resposta de resistência.

O RNA total de folhas, caule e raiz da soja resistente e suscetível, inoculadas e não inoculadas, foram extraídos, tratados e submetidos ao RT-PCR conforme descrito em "Materiais e Métodos". Os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados em intervalos de tempos de quatro dias, com o tempo zero correspondendo ao momento da inoculação com o fungo *Cercospora sojina*.

A escolha dos tempos teve a intenção de abranger um intervalo de tempo no qual a expressão de genes pudesse ser acompanhada pelo desenvolvimento dos sintomas da doença. No caso da cercosporiose ou mancha-olho-de-rã, os primeiros sintomas começam a ser percebidos por volta do décimo dia após a inoculação do patógeno (Cordeiro, 1992). Assim, as coletas foram feitas no dia zero, após quatro, oito e doze dias da inoculação. O fungo patogênico *C. sojina* Hara é o agente causal da cercosporiose, ou mancha-olho-de-rã, e promove grandes perdas no cultivo da soja no Brasil, atacando principalmente as folhas, mas também podendo causar prejuízos ao sistema vascular. Há evidências da existência de 25 raças do patógeno no Brasil e novas raças podem ocorrer (Yorinori e Klingelfuss, 2000).

A Figura 10 mostra o aparecimento de sintomas nas plantas de soja, inoculadas com o patógeno. Nenhum sintoma da doença foi percebido na variedade FT-Cristalina (resistente). Já a variedade suscetível inoculada apresentou folhas repletas de manchas características da doença quando comparada à planta não inoculada.

O RNA extraído de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm e armazenado a -80°C até seu uso. Os valores da absorbância a 260 nm devem estar acima de 0,1, enquanto a relação A_{260}/A_{280} ideal deve estar entre 1,8 e 2,0 indicando que não há contaminação significativa por proteínas ou resíduos de fenol que possam inibir a reação da transcriptase reversa. Todas as amostras extraídas e tratadas neste experimento apresentaram valores para a relação A_{260}/A_{280} dentro do limite ideal. A integridade deste RNA foi verificada em gel de agarose 0,8%. A presença de duas bandas distintas indicativas da preservação dos RNAs ribossômicos 18S e 28S mostrou

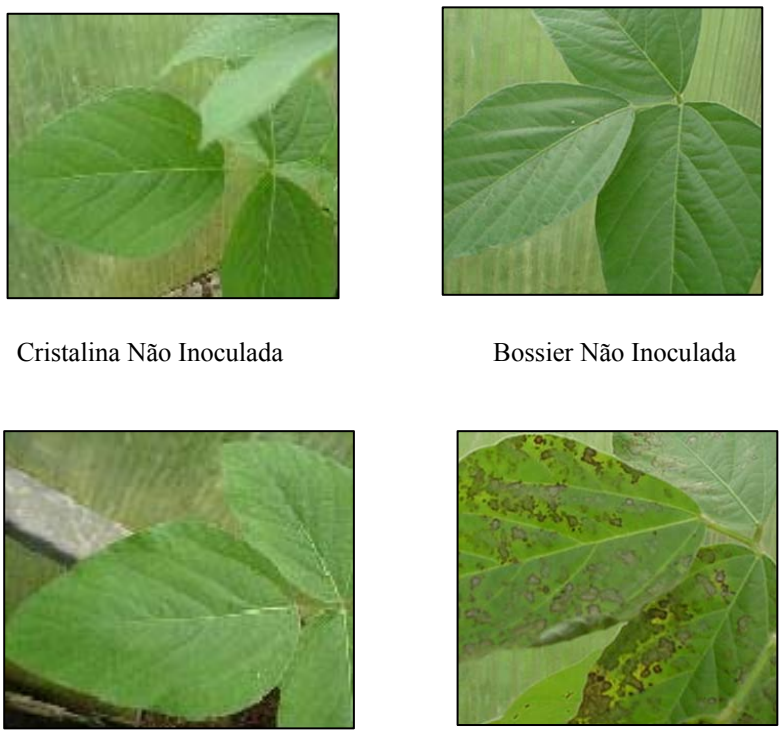

Figura 10 – Sintomas da doença cercosporiose manifestadas após 12 dias de inoculação do patógeno *Cercospora sojina*. Soja Cristalina, variedade resistente, Soja Bossier, variedade suscetível.

que as amostras extraídas apresentaram bom grau de integridade (dados não mostrados).

Uma vez confirmada a integridade do RNA, foram realizadas as reações de síntese do cDNA com posterior reação de PCR. A amplificação de uma banda distinta indica que a transcrição reversa iniciada com $oligo_{(dT)}$ foi eficiente e que os *primers* construídos amplificam seqüências funcionais. A utilização do $oligo_{(dT)}$ apresenta uma alta especificidade e produz fragmentos de RT-PCR mais consistentes do que quando se utiliza *primers* aleatórios que requerem otimização das condições da razão *primer*/RNA (Frohman et al, 1988). O uso deste oligonucleotídeo também permite que uma mesma população de cDNA fita simples possa ser amplificado com diferentes pares de *primers*.

Em todos os experimentos realizados não houve contaminação com DNA genômico, pois o RNA total foi previamente tratado com DNase para eliminar qualquer traço de DNA que pudesse contaminar as amostras. Isto foi confirmado pelos controles negativos, nos quais não há transcriptase reversa. Estes controles não apresentaram nenhuma banda amplificada (dados não mostrados). Um controle adicional foi feito com amplificação de fragmento de actina 3 de soja a partir do DNA genômico das variedades de soja FT-Cristalina e Bossier.

Inicialmente foi feita a amplificação do fragmento correspondente ao clone A5309-72 em diferentes órgãos da planta. A análise de detecção dos transcritos amplificados com os *primers* Perox-F e Perox-R, específicos para o clone A5309-72, similar à peroxidase, revelou amplificação de uma única banda, com tamanho aproximado de 700 pb (Figura 11). A temperatura de pareamento utilizada na reação de PCR para o clone A5309-72 e para o gene da actina foi de 59°C.

A amplificação do DNA genômico produziu um fragmento maior, aproximadamente 1200 pb indicando a provável presença de um íntron (Figura 11). Apenas a amostra de caule da variedade FT-Cristalina não apresentou amplificação do fragmento, todas as outras amostras de RNA de caule, raiz e folha das variedades resistentes e suscetíveis apresentaram amplificação de uma banda definida comprovando a existência de expressão desse gene em diferentes órgãos, ou seja, sua expressão não é órgão-específica.

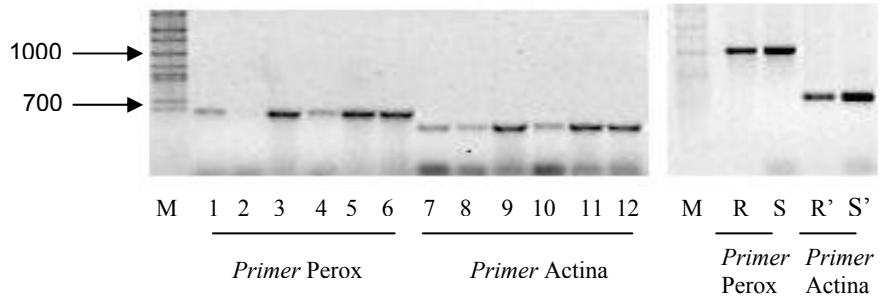

Figura 11. RT-PCR de diferentes órgãos das variedades de soja FT-Cristalina e Bossier com os *primers* específicos para o clone A5309-72 e para a ctina. Os números na parte inferior equivalem a diferentes amostras usadas: 1 e 7: RNA de folhas de FT-Cristalina; 2 e 8: RNA caule de Cristalina; 3 e 9: RNA de raiz de Cristalina; 4 e 10: RNA de folhas de Bossier; 5 e 11: RNA de caule de Bossier; 6 e 12: RNA de raiz de Bossier. DNA genômico amplificado com *primers* específicos para o clone A5309-72 e para actina, a letra R representa amostra de DNA de FT-Cristalina amplificada com *primer* específico, R' com *primer* para actina. A letra S representa amostra de Bossier amplificada com *primer* específico, S' com *primer* para actina. M representa o marcador de tamanho λ *Hin*d III (DNA de fago λ digerido com *Eco* RI, *Bam* HI e *Hin*d III).

Depois de verificada a expressão nos diferentes órgãos da planta foram realizados experimentos para verificar se a expressão do gene correspondente ao clone A5309-72 era influenciada pela inoculação do patógeno. Um RT-PCR, com amostras coletadas em diferentes tempos após a inoculação do patógeno, foi realizado para investigar o perfil funcional deste gene ao longo da exposição ao patógeno *C. sojina*. Devido a problemas

experimentais e escassez de tempo para padronização das condições para as reações de PCR os dados obtidos para este estudo diferencial são inconclusivos e inconsistentes para suportar uma discussão sobre a real expressão desse gene durante a resposta de defesa.

Contudo, estes experimentos deverão ser repetidos para obtenção de dados mais informativos, pois estes resultados são extremamente importantes para estabelecer os papéis funcionais dos genes identificados. Assim, as perspectivas para a continuidade deste trabalho visam a determinação funcional dos clones isolados e caracterizações moleculares complementares que deverão ser realizadas a fim de determinar qual o real papel destes clones no mecanismo de resistência a doenças nas plantas de soja.

5. Resumo e Conclusões

Dentre os fatores que causam prejuízos no cultivo de soja no Brasil as doenças têm ganhado destaque. Muitas pesquisas que visam o controle de pragas e doenças que atacam espécies economicamente importantes como a soja estão sendo desenvolvidas para encontrar uma maneira de proteger a lavoura e aumentar a sua produtividade.

A utilização de cultivares resistentes tem sido uma alternativa empregada para o controle de grandes epidemias em culturas agrícolas. Conhecer os mecanismos de resistência a patógenos é hoje uma ferramenta fundamental, pois o isolamento de genes de resistência e de genes envolvidos na resposta de defesa pode facilitar o entendimento da relação planta-patógeno e possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças.

O isolamento de seqüências transcritas similares a genes associados à resposta de resistência, realizado no presente trabalho, resultou na obtenção de três clones positivos a partir do *screening* de uma biblioteca de cDNA da variedade de soja FT-Cristalina com a sonda A53-09, similar a genes de resistência. Estes clones denominados A5309-47, A5309-71 e A5309-72, com tamanhos estimados de 2,0; 1,30 e 1,12 Kb, foram seqüenciados e suas seqüências de nucleotídeos foram analisadas quanto à similaridade com seqüências existentes no banco de dados do *GenBank*.

O clone A5309-47 possui uma ORF que potencialmente codifica uma proteína que apresentou alta similaridade com lipoxigenases, que são enzimas que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados resultando na produção de moléculas sinalizadoras jasmonato, metil jasmonato ou outros peróxidos lipídicos, que agem de maneira coordenada para amplificar o sinal de uma resposta específica. O clone A5309-71 possui uma ORF que potencialmente codifica uma proteína que apresentou similaridade com as enzimas estearoil-acil dessaturases; estas enzimas atuam na

produção de ácidos graxos poliinsaturados inserindo uma dupla ligação na posição delta, que promove aumento nos níveis destes ácidos e favorece a peroxidação lipídica e formação de moléculas sinais como as oxilipinas e o ácido salicílico.

Dentro da resposta de defesa, ativada na planta após o reconhecimento do patógeno, os clones A5309-47 e A5309-71 podem atuar diretamente na peroxidação de lipídeos para formação de metabólitos secundários que vão ativar vias específicas de sinalização sendo os responsáveis diretos ou indiretos da ativação de genes relacionados à patogenicidade.

O clone A5309-72 possui uma ORF que potencialmente codifica uma proteína similar às enzimas peroxidases de *Glycine max*. Estas enzimas promovem a remoção do peróxido de hidrogênio das células liberando moléculas reativas de oxigênio (ROS) que vão atuar como compostos tóxicos para os microrganismos impedindo o seu crescimento. As ROS produzidas a partir da atividade das peroxidases causam grandes prejuízos aos lipídeos atuando também na formação de compostos secundários de sinalização. O fortalecimento da parede celular também é uma atividade atribuída a este clone já que o H_2O_2 resultante da atividade destas enzimas promove a síntese de ligações cruzadas entre hidroxiprolinas e glicoproteínas ricas em prolina à matriz polissacarídica reforçando a parede celular.

A amplificação de fragmentos correspondente ao gene de peroxidase de amostras de caule, folha e raiz das variedades FT-Cristalina e Bossier, com *primers* específicos para o clone A5309-72, foi observada em todos os órgãos analisados exceto nas amostras de caule da variedade resistente onde não foi detectada nenhuma banda, indicando que a expressão deste gene não é órgão-específica. A análise da expressão diferencial do gene codificado por este clone foi realizada, por meio de RT-PCR para verificação do papel funcional deste gene na resposta de defesa em diferentes tempos de exposição ao patógeno *C. sojina*, porém os dados foram pouco conclusivos. É necessário então, repetir estes experimentos a fim de determinar o perfil de expressão destes genes, pois esta análise de expressão diferencial é extremamente importante para a determinação da atuação destes clones nos processos de defesas.

Os três clones isolados e seqüenciados neste trabalho contêm genes putativos que apresentaram alta similaridade com genes que codificam enzimas importantes que participam da resposta de defesa, mas a caracterização mais precisa da expressão do gene contido nos clones isolados poderá responder se, de fato, os genes correspondentes a eles estão envolvidos na defesa da soja contra patógenos. A partir dessa definição estes clones poderão ser utilizados em trabalhos futuros do programa de melhoramento

genético, visando o desenvolvimento de variedades resistentes, ou o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fitopatógenos.

Referências Bibliográficas

Aarts, N. Different requeriments for *EDS1* and *NDR1* by disease gene define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 95:** 10306-10311, 1998.

Adams, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merril, C.R.; Wu, A.; Olde, B.; Moreno, R.F.; Kerlavage, A.R.; Mccombie, W.R.; Venter, J.C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science, 252:** 1651–1656, 1991.

Agrios, G. **Plant Pathology.** Academic Press, San Diego, CA, 1998.

Ai-Guo Tian; Jun Wang; Peng Cui; Yu-Jun Han;·Hao Xu; Li-Juan Cong; Xian-Gang; Huang;·Xiao-Ling W.; Yong-Zhi J.; Bang-Jun W.; Yong-Jun W.; Jin-Song Z.; Shou-Yi C. Characterization of soybean genomic features by analysis of its expressed sequence tags**. Theoretical Applied in Genetic, 108:** 903–913, 2004.

Altuschul, S. F.; Madden,T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipmam, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research, 25:** 3389-3402, 1997.

Arantes, N. E.; Souza, P. I. M. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993.

Arumuganathan, K.; Earle, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report, 9:** 208–219, 1991.

Barros, E. G.; Rafalski, J. A. Analysis of hypervariable regions in the soybean genome. **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq),** p 43, resumo no. E82, Caxambu, MG, Maio de 1998.

Barros, E. G.; Tingey, S.; Rafalski, A. Sequence characterization of hypervariable regions in the soybean genome: leucine-rich repeats simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology, 23:** 411-415, 2000.

Benton, W. D.; Davis, R. W. *Screening* lambda gt recombinants clones by hybridization to single plaques *in situ*. **Science, 196:** 180-182, 1977.

Berrocal-Lobo, M.; Molina, A.; Solano, R. Constitutive expression of Ethylene Response Factor 1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **Plant Journal, 29:** 23-32, 2002.

Bertrand, J.; Laurent, C.; Leclercq, V. **O mundo da soja**. São Paulo: HUCITEC, 1987.

Bittner-Eddy PD, Beynon JL. The Arabidopsis downy mildew resistance gene, *RPP13-Nd*, functions independently of *NDR1* and *EDS1* and does not require the accumulation of salicylic acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions, 14:** 416–21, 2001.

Bonas, U.; Lahaye, T. Plant disease resistance triggerd by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology, 5:** 44-50, 2002.

Botella, M. A.; Parker, J. E.; Frost, L. N.; Bittner-Eddy, P. D.; Beynon, J. L.; Daniels, M. J.; Holub, E. B.; Jones, J. D. G. Three genes of Arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distint *Penorosport parasitica* avirulence determinants. **The Plant Cell, 10:** 1847-1860, 1998.

Bowell, G. P. Role of active pxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology, 2:** 287-294, 1999.

Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Ed. Courier Companies, Inc. USA. 1044-1154, 2000.

Chien, C. T.; Bartel, P. L.; Sternglanz, R.; Fields, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 88:** 9578-9582, 1991.

CONAB. Previsão e acompanhamento da safra 2003/04. Quinto levantamento. www.conab.gov.br. 2005.

Cordeiro, A.C.C.; Sediyama, T.; Gomes, J.L.L.; Sediyama, C.S.; Reis, M.S. Herança da resistência da soja a *Cercospora sojina* Hara, isolado de São Gotardo, Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, 27:** 1035-1042, 1992.

Creelman, R.; Mulpuri, R. The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. **The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists,** 2002.

Cregan, P.B.; Jarvik, T.; Bush, A.L.; Shoemaker, R.C.; Lark, K.G.; Kahler, A.L.; Kaya, N.; Vantoai, T.T.; Lohnes, D.G.; Chung, J.; Specht, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science, 39:** 1464–1490, 1999.

Croft, K. P. C.; Jüntter, F.; Slusarenko, A. J. Volatiles Products Of The lipoxygenase pathway envolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaselicola. **Plant Physiology, 101:** 13-24, 1993.

Dangl, J. L.; Jones, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature, 411:** 826–833, 2001.

De Gara, L.; Pinto, M. C.; Tommasi, F. the antioxidant systems vis-à-vis reative oxygen species during plant-pahogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry, 41:** 863-870, 2003.

De Wit, P. J. G. M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant phatogens. **Annual Review of Phytopathology, 30:** 391-418, 1992.

Delseny, M.; Cooke, R.; Raynal, M.; Grellet, F. The *Arabidopsis thaliana* cDNA sequencing projects. **Federation European Biochemical Societies - Letters., 403:** 221–224 assessment. **Genome Research, 8:** 75–185, 1997.

Durner, J.; Wendehenne, D.; Klessig, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 95:** 10328–33, 1998.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Tecnologia de produção da soja – Região Central do Brasil, 2003. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste; ESALQ, Embrapa Soja/Sistemas de Produção 1, 2002.

Ewing, R. M.; Kahla, A. B.; Poirot, O.; Lopez, F.; Audic, S.; Claverie, J. M. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. **Genome Research, 9:** 950–959, 1999.

Fernandes, J.; Brendel, V.; Gai, X.; Lal, S.; Chandler, V.L.; Elumalai, R.P.; Galbraith, D.W.; Pierson, E.A.; Walbot, V. Comparison of RNA expression profiles based on maize expressed sequence tag frequency analysis and micro-array hybridization. **Plant Physiology, 128:** 896–910, 2002.

Feussner, I.;Wasternack, C. The lipoxigenase pathway. **Annual Review of Plant Biology, 53:** 275–297, 2002.

Flor, H. H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology, 9:** 275-296, 1971.

Gobel, C.; Feussner, I.; Schmidt, A.; Scheel, D.; Sanchez-Serrano, J.; Hamberg, M.; Rosahl, S. Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. **The Journal of Biological Chemistry, 276:** 6267-6273, 2001.

Godoy, C. A.; Cantari, M.G. Efeito da severidade do oídio e crestamento foliar de *Cercospora* na produtividade da cultura de soja. **Fitopatologia Brasileira, 29:** 526-531, 2004.

Goldberg R. B. DNA sequence organization in the soybean plant. **Biochemistry. Genetic, 16:** 45–68, 1978.

Gravina, G. A.; Martins-Filho, S.; Sedyama, C.S.; Cruz, C. D. Parâmetros genéticos da resistência da soja a *Cercospora sojina*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39:** 653-659, 2004.

Hammond-Kosack, K.; Parker, J. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology, 14:** 177–193, 2003.

Higa, A.; Hidaka, T.; Minai, Y.; Matsuoka Y.; Haga M. Active oxygen radicals induce peroxidase activity in rice blade tissues. **Bioscience, Biotechnology.and Biochemistry, 65:** 1852-1855, 2001.

Hildebrand, D. F.; Afithile, M.; Fukushige, H. Lipids and signaling: oxylipins 2-futher reactions for oxylipin production. **Biochemical Society Transactions, 28:** 847-849, 2000.

Hildebrand, D. F.; Rodrigues, J. G.; Legg C. S.; Brown, G. C.; Bookjans, G. The effects of wounding and mite infestation on soybean leaf lipoxygenase levels. **Zeitschrift für Naturforschung, 44:** 655-659, 1989.

Igreja, A. C. M.; Packer, M. F.; Rocha, M. B. A evolução da soja no Estado de Goiás e seu impacto na composição agrícola. São Paulo: IEA, 1988.

Jones DA, Jones JDG. The roles of leucine-rich repeats in plant defences. *Adv. Bot. Res. Adv.* **Plant Pathology, 24:** 90–167, 1996.

Jones, D.A.; Thomas, C. M.; Hammond-Kosack, K. E.; Balint-Kurti, P. J.; Jones, J.D.G. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science, 266:** 789–93, 1994.

Joosten, M. H. A. J.; Vogelsang, R.; Cozijnsen, T. J.; Verberne, M. C.; De Wit, P. J. G. M. The biotrofic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents *Cf-4*-mediated resistance by producing unstable *Avr-4* elicitors. **The Plant Cell, 9:** 367-379, 1997.

Kachroo, A.; Venugopal, S. C.; Lapchyk, L.; Hildebrand, D.; Kachroo, P. Oleic acid levels regulate by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 101;** 5152-5157, 2004.

Kanazin, V.; Marek, L. F.; Shoemaker, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 93:** 11746-11750, 1996.

Keller, T.; Dmud, H. G.; Werner, D.; Doerner, P.; Dixon, R. A.; Lamb, C. A plant homolog of neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca^{2+} binding motifs. **The Plant Cell, 10:** 255-266, 1998.

Lahaye, T. Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana RRS1-R* and its interaction with *Ralstonia solanacearum popP2*. **Trends in Plant Science, 9:** 1-4, 2004.

Liu, F.; Zhuang, B.C.; Zhang, J.S.; Chan, S.Y. Construction and Analysis of Soybean Genetic Map. **Acta Genetica Sinica, 27:** 1018– 1026, 2000.

Loegering, W. Q. H H Flor: pioneer in phytopathology. **Annual Review in Phytopathol, 25:** 59-66, 1987.

Maarten, H. S.; Custers, J. H.V. Engineering disease resistance in plants. **Nature, 411:** 865-868, 2001.

Mackey D, Holt III BF,Wiig A, Dangl JL. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* Type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in Arabidopsis. **Cell, 108:** 743–54, 2002.

Marcelino, F. C. **Isolamento de seqüências homólogas a genes de resposta à resistência a doenças em soja.** Viçosa, MG: 2002. 99p (Tese MS).

Marek, L. F.; Mudge, J.; Darnielle, L.; Grant, D.; Hanson, N.; Paz, M.; Huihuang, Y.; Denny, R.; Larson, K.; Foster-Hartnett, D.; et al. Soybean genomic survey: BAC-end sequences near RFLP and SSR markers. **Genome, 44:** 572–581, 2001.

Martin, G. B.; Brommonschenkel, S. H.; Chunwongse, J.; Frary, A.; Ganal, M. W.; Spivey, R.; Wu, T.; Earle, E. D.; Tanksley, S. D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science, 262:** 1432-1436, 1993.

Martins, M. F. **Caracterização de sondas hipervariáveis e de uma sequência genômica de soja homóloga a genes de resistência a doenças.** Viçosa, MG: UFV, 2000.71p (Tese DS).

McDowell, J.M., Dangl, J.L. Signal transduction in the plant innate immune response. **Trends Biochemical Science, 25:** 79–82, 2000.

Melan, M. A.; Dong, X.; Endara, M. E.; Davis, K. R.; Ausubel, F. M.; Petterman, T. K. An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology, 101:** 441-450, 1993.

Mueller, C. C.; Bustamante, M. **Análise da expansão da soja no Brasil**. s/l, abr. 2002. www.worldbank.org/rfpp/news/debates/mueller.pdf.

Nandi, A.; Krothapalli, K.; Busemam, C. M.; Li, M.; Welti, R.; Enyedi, A.; Shah, J. *Arabidopsis sfd* mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficience of a fatty acid desaturase. **The Plant Cell, 15:** 2383-2398, 2003.

Nandi, A.; Welti, R.; Shah, J. The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *Sppressor of Fatty acid Desaturase Deficiency* 1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. **The Plant Cell, 16:** 465-477, 2004.

Nimchuk, Z.; Eugem, T.; Holt III, B. F.; Dangl, J. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetic, 37:** 579-609, 2003.

Nordberg, J. E; Arnér, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology e Medicine, 31:** 1287-1312, 2001.

Okubo, K.; Hori, N.; Matoba, R.; Niiyama, T.; Matsubara, K. A novel system for large-scale sequencing of cDNA by PCR amplification. **DNA Sequence, 2:** 137–144, 1991.

Oliveira, G.; Oliveira, M. G. A.; Pires, C. V.; Batista, R. B.; Piovisan, N. D.; Gomes, M. R. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A. Efeito do ácido jasmônico na atividade de lipoxigenases de plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Ciência Agrotécnica, 26:** 1143-1151, 2002.

Palmer, R.G.; Pfeiffer, T.W.; Buss, G.R.; Kilen, T.C. **Qualitative Genetics**. In HR Boerma and JE Specht, eds, Soybeans: Improvement, Production, and Uses, Ed 3, Agronomy Monograph No. 16. **American Society of Agronomy-Crop Science Society of America-Soil Science Society of America, Madison, WI,** pp 137–234, 2004.

Parker, J.E., Coleman, M.J., Szabo, V., Frost, L.N., Schmidt, R., van der Biezen, E.A., Moores, T., Dean, C., Daniel, M.J., and Jones, J.G.D. (1997). The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. **The Plant Cell, 9:** 879–894.

Pennickx, I. A. M. A.; Thomma, B. P. H. J.; Buchala, A.; Metraux, J. P.; Broekaert, W. F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of plant defensin gene in *Arabidopsis*. **The Plant Cell, 10:** 2103-2113, 1998.

Petersen, M.; Brodersen, P.; Naested, H.; Andreasson, E.; Lindhart, U. Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. **Cell, 103:** 1111–20, 2000.

Pinho, C. A soja é pop. **Istoé. 1796:** 80-81, 2004.

Rafalski, A. J.; Tingey, S. V. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N=40. **IN S.J. O'Brien (ed.) Genetic maps.** Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993, pp. 6149-6156.

Reis, E. M.; Kimati, H. Nota sobre a ocorrência de *Cercospora sojina* Hara causando a mancha "olho-de-rã" no Rio Grande do Sul. **O Solo, 65:** 34, 1973.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 74:** 5463-5467, 1977.

Sanger, T.; Wichard, T.; Kunze, S.; Gobel, C.; Lerchi, J.; Pohnert, G.; Feussner, I. A multifunctional lipoxigenase with fatty acid hidroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. **The Journal of Biological Chemistry, 280:** 7588-7596, 2005.

Shoemaker, R.; Keim, P.; Vodkin, L.; Retzel, E.; Clifton, S. W.; Waterston, R.; Smoller, D.; Coryell, V.; Khanna, A.; Erpelding, J.; Gai, X.; Brendel, V.; Raph-Schmidt, C.; Shoop, E. G.; Vielweber, C. J.; Schmatz, M.; Pape, D.; Bowers, Y.; Theising, B.; Martin, J.; Dante, M.; Wylie, T.; Granger, C. A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. **Genome, 45:** 329–338, 2002.

Silva, F. B.; Oliveira, M. G. A.; Batista, R. B.; Pires, C. V.; Xavier, L. P.; Piovisan, N. D.; Oliveira, J. A.; José, I. C.; Moreira, M. A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia Gemmatalis Hubner*.). **Arquivo do Instituto Biológico, 69:** 67-74, 2002.

Sinapidou, E.; Willians, K.; Nott, L.; Bahkt, S.; Tor, M.; Crute, I.; Brittner-Eddy, P.; Beynon, J. Two TIR:NB:LRR genes are required to specify resistance to *Peronospora parasitica* isolate Cala2 in A*rabidopsis* .**The Plant Journal, 38:** 898-909, 2004.

Singh, R. J.; Hymowitz, T. The genomic relationship between Glycine max (L.) Merr. and G. soja Sieb. and Zucc. as revealed by pachytene chromosome analysis. **Theoretical Applied in Genetic, 76:** 705–711, 1988.

Stacey, G.; Voldkin, L.; Parrott, W. A.; Shoemaker, R. C. National science foundation-sponsored workshop report. Draft plan for soybean genomics. **Plant Physiology, 135:** 59-70, 2004.

Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., and Jones, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science, 268:** 661–667, 1995.

Stinzi, A.; Browse, J. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr*3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, 97:** 10625-10630, 2000.

Storz, G.; Imalay, J. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology, 2:** 188-194, 1999.

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

Torres, M. A.; Onouchou, H.; Hamada-Achida, C.; Hammond-Kosack, K. E.; Jones, J. D. G. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of human respiratory burst oxidative (gp91^{phox}). **Plant Journal, 14:** 365-370, 1998.

Vieira, A. A.; Oliveira, M. G. A.; José, I. C.; Piovesan, N. D.; Rezende, S. T.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13:** 5-12, 2001.

Wadsworth, G. J.; Redinhbaugh, M. G.; Scadalios, J. G. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. **Analytical Biochemistry, 172:** 277-283, 1988.

Wang, G. L.; Ruan, D. L.; Song, W. Y.; Sideris, S.; Chen, L.; Pi, L.; Whalen, M. C.; Zhang, S.; Fauquet, C.; Ronald, P. C. The rice disease resistance gene, *Xa21D*, encodes a receptor-like molecule with a LRR domain that determines race specific recognition and is subject to adaptive evolution. **The Plant Cell, 10:** 765-780, 1998.

Weber, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science, 7:** 217-224, 2002.

Xu, B.; Zhen, H.Y.; Lu, Q.H.; Zhao, S.W.; Zhou, S.H.; Hu, Z.A.Three new evidences of the original area of soybean. **Soybean Science, 5:** 123–130, 1986.

Xu, Y.; Chang, P. F. L.; Liu, D.; Narasimhan, M. L.; Raghothama, K. G.; Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **The Plant Cell, 6:** 1077-1085, 1994.

Yorinori, J. T. Metodologia de produção de *Diaporthe phaseolorum* f. Sp. *Meridionalis*. **Fitopatologia Brasileira, 16:** 58-60, 1991.

Yorinori, J. T. Soja no Paraná. Curitiba**:** IPEAME (circular 9). 29p., 1971.

Yorinori, J. T.; Klingelfuss, L. H. Novas raças de *Cercospora sojina* em soja. **Fitopatologia Brasileira, 24:** 509-512, 2000.

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

Zhang, Z. A.; Xing, P.; Staswick, T.; Clemente, T. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. **Plant Cell Tissue Organ Culture, 556:** 37–46, 1999.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo