TALLES EDUARDO FERREIRA MACIEL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE DA β-TUBULINA EM *Phakopsora pachyrhizi*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

TALLES EDUARDO FERREIRA MACIEL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE DA β-TUBULINA EM *Phakopsora pachyrhizi*

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

APROVADA: 29 de abril de 2008.

Prof[a] Valéria Monteze Guimarães
(Coorientador)

Prof[a] Karla Suemy Clemente Yotoko
(Coorientador)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Dr[a]. Eunize Maciel Zambolim

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

À minha mãe Carmem Albino Ferreira Maciel, pela luta diária, sacrifício, abdicação, amor, amizade, educação, incentivo e pelo exemplo de vida,

Ao meu pai Tarcis Ferreira Maciel (*in memoriam*), por mostrar-me que "pequenas" situações podem ter um significado imenso, dependendo da maneira como as enxergamos e como enxergamos a vida,

À minha irmã, pela cumplicidade e torcida,

Ao meu irmão, pela amizade e apoio,

Aos meus cunhados(as), pelos excelentes momentos compartilhados,

Aos meus sobrinhos Bruna e Luiz Gustavo, pelo amor e carinho,

À minha avó, pelas orações diárias, por se preocupar comigo e pelos constantes ensinamentos,

A Deus, por direcionar o meu caminho e me manter feliz e fortalecido neste mundo,

A todos os professores, heróis que passaram por minha vida, desde minha alfabetização,

Dedico

Ao meu único e verdadeiro amor, pelo carinho e compreensão e por me fazer uma pessoa melhor... Minha doce Kamila,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade, por não me deixar cair, sempre segurando minha mão.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Luiz Orlando de Oliveira, pela orientação, pelos ensinamentos de dedicação sublime à ciência, pelos ensinamentos éticos e pela amizade.

À professora Karla Suemy Clemente Yotoko, pela coorientação e pelas sugestões.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelo apoio e críticas construtivas.

Às professoras Valéria Monteze Guimarães e Eunize Maciel Zambolim, pela participação na defesa desta dissertação e pelas importantes sugestões.

Ao Professor Cosme Damião Cruz pelos constantes ensinamentos, por disponibilizar-me o laboratório, pelo exemplo de competência e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório de sequenciamento, que me ensinaram, ampararam e estimularam durante as etapas deste trabalho, proporcionando assim momentos que jamais serão esquecidos.

Aos amigos do laboratório de Bioinformática, pela agradável convivência.

A todos os colegas de Pós-Graduação da UFV, pelos momentos compartilhados.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Talles Eduardo Ferreira Maciel, filho de Tarcis Ferreira Maciel e Carmen Albino Ferreira Maciel, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, no dia 06 de agosto de 1981.

Em abril de 2001, iniciou o curso de graduação em Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, tendo transferido para o curso de Bioquímica no primeiro semestre de 2003 e graduando-se em maio de 2006.

Em maio de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em abril de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO VI

ABSTRACT VIII

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVO 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

3.1. *β*-TUBULINA 4

3.2. SOJA 5

3.3. *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* 6

3.3.1. EXPANSÃO MUNDIAL 7

3.3.2. FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA E PERDAS ECONÔMICAS 8

3.3.3. SINTOMATOLOGIA 9

4. MATERIAL E MÉTODOS 12

4.1. AMOSTRAGEM 12

4.2. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL 13

4.3. TESTE DE QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO DNA 14

4.4. DESENHO DOS PRIMERS 14

4.5. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS 15

4.6. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR 16

4.6.1. PURIFICAÇÃO COM O KIT EXOSAP- IT 16

4.6.2. PURIFICAÇÃO DO DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE 16

4.7. SEQUENCIAMENTO DO DNA 17

4.8. ANÁLISES DE DADOS 17

5. RESULTADO E DISCUSSÕES 20

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA *β*-TUBULINA DE *PHAKOPSORA PACHYRHIZI* 20

5.2. ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQUÊNCIA PROTÉICA DE β-TUBULINA 26

5.3. ÁRVORE FILOGENÉTICA COM BASE NO GENE DA β-TUBULINA 31

5.4. COMPARAÇÃO DOS ÍNTRONS DE FUNGOS CAUSADORES DE FERRUGENS 34

6. CONCLUSÕES 36

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38

RESUMO

MACIEL, Talles Eduardo Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2008. Caracterização molecular do gene da β-tubulina em *Phakopsora pachyrhizi*. Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Coorientadores: Karla Suemy Clemente Yotoko e Valéria Monteze Guimarães.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização molecular do gene da β-tubulina de *Phakopsora pachyrhizi* e da proteína codificada por este gene. Uredósporos foram coletados em sete municípios brasileiros. O DNA genômico foi extraído e o gene da β-tubulina amplificado pela técnica de PCR, por meio de cinco combinações de *primers* específicos de modo a cobrir toda a região desejada. Os fragmentos obtidos foram purificados e sequenciados. As sequências foram alinhadas e comparadas entre si e com sequências obtidas no GenBank. O gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* apresentou 2815 pares de bases, sendo constituído de nove éxons e oito íntrons. Sua fase aberta de leitura (ORF) apresentou 1341 pares de bases. Verificou-se que 452 pares de bases são correspondentes à região promotora, enquanto 234 pares de bases pertencem à extremidade 3' não traduzida. A região promotora apresentou os sinais típicos envolvidos com o início da transcrição, sendo três possíveis sequências *TATA* box e cinco possíveis sequências *CAAT* box. Um domínio de 30 nucleotídeos, constituído por citosina e timina, está contido na região promotora entre os pares de bases -205 e -175 upstream ao códon de inicio da tradução. Sítios envolvidos no mecanismo de *splicing* estão presentes, flanqueando os oito íntrons, sendo o sítio GT(A/G)(N)GT encontrado na extremidade 5' do íntron e o sítio (C/T)AG na extremidade 3'. A sequência consenso AATAAA, que desempenha papel importante no processo de poliadenilação do mRNA precursor, foi encontrada a 44 pares de bases *downstream* do códon de terminação TAG. A ORF encontrada para este gene codifica uma proteína constituída por 446 aminoácidos, a qual apresenta elevada identidade (acima de 89%) com β-tubulina de outras espécies de fungos relacionados. Ao comparar a sequência de aminoácidos predita para β-tubulina, verificou-se que esta proteína possui quatro domínios conservados, sendo eles: domínio de ligação a nucleotídeos, domínio de ligação ao taxol, domínio de interface alfa/beta e domínio de interface beta/alfa. Análises filogenéticas, com base no alinhamento do gene da β-tubulina, proporcionaram a

alocação de *P. pachyrhizi* junto aos demais fungos causadores de ferrugens. Comparação dos íntrons do gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* com íntrons de *Melampsora lini e Uromyces fabae*, sendo as duas últimas as únicas espécies de fungos causadores de ferrugens com o gene da β-tubulina completamente sequenciado até o momento, mostrou conservação no número e posição dos íntrons. Entretanto, as sequências correspondentes a cada um dos íntrons mostraram baixa identidade (aproximadamente 30%).

ABSTRACT

MACIEL, Talles Eduardo Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2008. Molecular characterization of the β-tubulin gene in *Phakopsora pachyrhizi*. Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Coadvisers: Karla Suemy Clemente Yotoko and Valéria Monteze Guimarães.

This study was carried out to characterize either the β-tubulin gene from the *Phakopsora pachyrhizi* and the protein codified by this gene. The urediniospores were collected in seven Brazilian counties. The genomic DNA was extracted and the β-tubulin gene was amplified by PCR technique through five combinations of specific *primers* on such a way to covering the whole region under study. Then, the obtained fragments were purified and sequenced. The sequences were aligned and compared among each others and with sequences obtained in the GenBank. The β-tubulin gene from *P. pachyrhizi* showed 2815 pairs of bases and was constituted by nine exons and eight introns. Its opened reading phase (ORF) showed 1341 base pairs**.** It was verified that 452 base pairs correspond to the promoter region, whereas 234 pairs belong to the untranslated extremity 3'. The promoter region showed the typical signs involved in the beginning of the transcription, as being three possible sequencies TATA box and five possible sequencies CAAT box. A domain of 30 nucleotides constituted by cytosine and thymine is inside the promotor region between the basis pairs -205 and -175 upstream the codon beginning the translation. Some sites involved in the splicing mechanism are found, as flanking those eight introns, whereas the site GT(A/G)(N)GT was found at the extremity 5' of the intron and the site (C/T)AG at extremity 3'. The consensus sequence AATAAA that plays an important role in the polyadenilation process of the precursory mRNA was found after 44 pairs of bases downstream the TAG termination codon. The ORF found for this gene codifies a protein constituted by 446 amino acids, that shows high identity (above 89%) with β-tubulin in other fungus species related. When comparing the amino acid sequence predicted for β-tubulin, this protein was identified to have four conserved domains as follows: domain of linkage to nucleotides, domain of linkage to taxol, domain of alpha/beta interface and domain of beta/alpha interface. The phylogenetic analyses based on alignment of the β-tubulin gene provided the allocation of *P. pachyrhizi* together with the other fungus causing the rusts. The comparison of the introns of the β-tubulin gene of *P. pachyrhizi* with introns of

Melampsora lini and *Uromyces fabae*, as the two last ones being the only rust-causing fungus species with the β-tubulin gene completely sequenced until the moment, showed that both number and position of the introns were conserved. However, the sequences corresponding to each intron showed low identity (around 30%).

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a importância da soja é indiscutível, principalmente em países produtores e exportadores como o Brasil, onde a geração de divisas e a balança comercial são totalmente dependentes do setor primário da economia. A soja constitui uma das principais culturas do mundo e a segunda mais importante do Brasil (Stokstad, 2005), que é o segundo maior produtor mundial, respondendo por 25 % da oferta global do produto (FAO, 2008). Em 2003, o Brasil se tornou o maior exportador mundial de soja, superando os Estados Unidos. Stokstad (2005) estimou que, até o final desta década, o Brasil terá superado a produção dos EUA, detentores da maior produção mundial.

No entanto, este sucesso está sendo ameaçado pela ferrugem asiática da soja, doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* que, em condições ótimas, tem causado perdas de até 90 % na produtividade. Esta doença tem atingido a maioria dos países que cultivam a soja, tendo chegado ao Brasil em 2001. Atualmente, é encontrada em todos os estados brasileiros produtores de soja. A aplicação de fungicidas sistêmicos tem constituído o principal procedimento de controle da doença, sendo as proteínas tubulinas o alvo das ações de uma classe destes fungicidas.

As tubulinas são as principais constituintes dos microtúbulos, sendo estes responsáveis pela formação do citoesqueleto. São encontradas em todos os eucariotos e exercem um papel crítico em vários processos celulares, tais como a motilidade celular, transporte citoplasmático e divisão celular.

A identificação e caracterização do gene da β-tubulina em *P. pachyrhizi* poderá abrir caminhos para a elucidação de características funcionais deste gene. Wolfgang et al. (2004) ressaltaram a importância em se estudar íntrons, ao mostrar que estes elementos são essenciais e específicos para a expressão e regulamento de genes de tubulina.

A sequência de nucleotídeos do gene da β-tubulina, assim como a sequência de aminoácidos da proteína codificada por ele têm sido extensivamente usadas para estimar relações filogenéticas em fungos. Os resultados destas análises são

importantes para a estimativa e análise de parentesco entre os organismos e são indispensáveis ao entendimento dos processos evolutivos (Tuszynski et al., 2006).

2. OBJETIVO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de caracterizar o gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* e a proteína codificada por ele. Com base nos resultados e de posse de outras sequências obtidas no GenBank, foram investigadas as relações evolutivas entre *P. pachyrhizi* e outros fungos filogeneticamente relacionados. Esses dados irão fornecer informações para responder às seguintes perguntas:

- Qual é o tamanho do gene da β-tubulina e de sua correspondente proteína em *P. pachyrhizi*?
- Quantos éxons e íntrons este gene possui?
- A região promotora deste gene apresenta os sinais típicos envolvidos com o início e regulação da transcrição? Os íntrons em estudo apresentam as sequências típicas envolvidas no seu mecanismo de *splicing*? A região 3' não traduzida (UTR) apresenta a sequência consenso responsável pela adenilação do mRNA?
- Qual é o nível de identidade entre a sequência de aminoácidos da β-tubulina de *P. pachyrhizi,* quando comparada à mesma proteína de outros fungos relacionados?
- Qual é a relação entre tamanho, número, posição e sequência de nucleotídeos dos íntrons encontrados em *P. pachyrhizi* com os íntrons de *Melampsora lini* e *Uromyces fabae*, sendo estas as duas únicas espécies causadoras de ferrugens, que apresentam o gene da β-tubulina completamente sequenciado?

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. β-tubulina

As tubulinas são as principais proteínas formadoras dos filamentos protéicos cilíndricos chamados microtúbulos, os quais são, por sua vez, responsáveis pela formação do citoesqueleto de células eucarióticas (Stotz & Long, 1999). Estes são encontrados em todos os eucariotos e desenvolvem papel crítico em uma variedade de processos celulares, incluindo motilidade celular, transporte citoplasmático e divisão celular (Hyams & Lloyd, 1994). As tubulinas constituintes dos microtúbulos formam um hetero-dímero composto de duas cadeias polipeptídicas homólogas, designadas α e β-tubulinas; embora exista uma família de tubulinas subdividida em seis classes com base na conservação da sequência e em suas respectivas funções (Postingl et al., 1981).

A β-tubulina tem despertado significante interesse no meio científico devido à alta conservação da sequência de aminoácidos. Tal fato faz com esta proteína seja alvo de fungicidas do grupo benzimidazol, os quais são usados como forma de controle de diversos patógenos (Cooley & Caten, 1993). A interação entre β-tubulina e o benzimidazol tem sido amplamente estudada em diversos fungos patogênicos. Segundo Beom-Gi et al. (2001), mutações neste gene podem conferir resistência a fungicidas, uma vez que ocorre a inibição da ligação do fungicida devido à alteração da estrutura tridimensional da proteína (Kawchuk et al., 2002). Este gene tem sido usado ainda para promover informações sobre funções dos microtúbulos e da divisão celular ainda desconhecidas (Ayliffe et al., 2001).

Genes que codificam β-tubulina em fungos geralmente variam entre filos, mas são altamente conservados em espécies relacionadas (Stefan et al., 2004; Kawchuk et al., 2002).

A caracterização deste gene em *Basidiomicetos* revelou que este pode ser composto por oito, nove ou dez éxons, que juntos podem codificar uma proteína de 445, 446, 447 ou 448 aminoácidos, e, portanto, não existe um padrão quanto ao número de éxons e aminoácidos entre as espécies pertencentes a este filo. No

entanto, em espécies pertencentes à ordem *Uredinales*, verificou-se igual número de íntrons e éxons neste gene (Ayliffe et al., 2001; Van Der Merwe, 2007).

3.2. Soja

Apesar de conhecida e explorada no oriente há mais de cinco mil anos, sendo uma das mais antigas plantas cultivadas no Planeta, o ocidente ignorou o cultivo da soja até a segunda década do século vinte, quando os EUA iniciou sua exploração, primeiro como forrageira e, posteriormente, como grãos (Costa et al., 2004).

Os primeiros relatos de seu cultivo comercial no Brasil datam de 1914, no Rio Grande do Sul. No entanto, somente a partir dos anos 40 é que a soja adquiriu importância econômica, figurando o Brasil pela primeira vez como seu produtor nas estatísticas internacionais (Dall´Agnol, 2004). A soja foi plantada de forma extensiva em território brasileiro, fazendo com que a área plantada aumentasse a cada ano. Esta expansão foi devida a vários fatores, tais como: influência da política de subsídios ao trigo, boa adaptabilidade dos cultivares originários do Sul dos Estados Unidos e o aproveitamento da infra-estrutura utilizada para o cultivo do trigo, que permanecia ociosa no período de entressafra (Costa, 1996). Na década de 70, a soja consolidou-se definitivamente como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhões de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas (1979). O incentivo ao seu plantio fez com que a produtividade crescesse a cada ano a partir da década de 80, aumentando, assim, sua competitividade no mercado internacional.

Segundo Sediyama et al. (1996), a expansão cada vez maior de áreas irrigadas nos cerrados, aliada aos programas de melhoramento, possibilitou o cultivo da soja nas estações de outono e inverno, aumentando ainda mais a produção do país e consequentemente, sua participação no cenário mundial.

Atualmente, o complexo agroindustrial da soja engloba principalmente segmentos de grãos, farelo e óleo, correspondendo a 19% de tudo o que o Brasil exportou em 2006, ou seja, aproximadamente dez bilhões de dólares agregados diretamente e outros 50 bilhões gerados em benefícios indiretos (CNA, 2007). Sua importância no cenário agrícola ultrapassa os limites das fazendas, englobando os

setores de pesquisa e tecnologia, agroindústria, logística, cadeias produtivas e até mesmo questões sociopolíticas.

3.3. *Phakopsora pachyrhizi*

É um fungo endêmico do hemisfério oriental, pertencente ao filo *Basidiomiceto*, classe *Urediniomiceto*, ordem *Uredinales*, família *Phakopsoraceae,* gênero *Phakopsora* e a espécie *Phakopsora pachyrhizi*. Constitui-se hoje no principal problema para a cultura de soja no Brasil, assim como em todo o mundo, levando a um gasto anual no país de aproximadamente 2,5 bilhões de reais devido à utilização de fungicidas sistêmicos (Yorinori et al., 2005).

A ferrugem da soja pode ser causada por duas espécies de fungos: *P. pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), agente etiológico da ferrugem asiática e *P. meibomiae* (Arthur) Arthur, agente etiológico da ferrugem americana.

A primeira, conhecida no Oriente desde 1914, é mais agressiva e causa perdas de 5% a 80% (Kawuki et al., 2003). Infecta aproximadamente 95 espécies de plantas pertencentes a mais de 42 gêneros diferentes e está presente em, praticamente, todas as regiões produtoras de soja do mundo. Manifestou-se no Brasil a partir da safra 2000/01, e, atualmente, tendo sido identificada em todas as regiões brasileiras produtoras de soja.

A segunda, originária do hemisfério ocidental, principalmente América do Sul e Caribe, é menos agressiva (Ono et al., 1992). Ocorre naturalmente em diversas leguminosas do mundo sem causar danos, sendo que, no Brasil, foi identificada pela primeira vez na região de Lavras (MG), em 1979.

Assim como os demais fungos causadores das ferrugens, são classificados como biotróficos, ou seja, necessitam de um hospedeiro vivo para sobreviverem e multiplicarem (Mendgen et.al., 2006).

3.3.1. Expansão mundial

P. pachyrhizi foi descrita pela primeira vez no Japão, em 1902. Em 1914, surgiu em caráter epidêmico em vários países no sudoeste da Ásia e, em 1976, foi descrita em Porto Rico, sendo este, o primeiro relato da ferrugem asiática na América (Vakili & Bromfield, 1976). Na década de 90, a doença foi relatada em Uganda, Kenia e Ruanda, sendo reportada em Zimbábue e Zambia, em 1998 (Levy, 2004; 2005). Foi constatada pela primeira vez no Paraguai e no Estado do Paraná em 2001. Na safra 2001/2002, apresentou grande expansão no Brasil, atingindo oito estados (GO, MG, MS, MT, PR, SC, SP e RS). Na safra 2002/2003, foi identificada em praticamente todas as regiões produtoras de soja do Brasil.

Acredita-se que uredósporos do fungo tenham atravessado o Oceano Atlântico, vindo de países do sul da África, uma vez que estes esporos são disseminados pelo vento. Esta hipótese foi fortalecida por Freire et al. (2008), os quais realizaram análises moleculares filogeográficas, demonstrando que os ribótipos de maior ocorrência no Brasil e alguns de menor ocorrência foram identificados também na África, sugerindo, desta forma, uma relação de ancestralidade entre estes indivíduos. O fato de os ribótipos de maior ocorrência no Brasil serem identificados também na Ásia, sugere que *P. pachyrhizi* encontrada no Brasil tem múltiplas origens.

Desde a primeira detecção, a importância da ferrugem asiática no Brasil tornou-se incontestável devido, principalmente, às perdas severas que tem causado na cultura da soja.

Devido à falta de barreiras fitossanitárias, o fungo está se espalhando para novas regiões a cada ano (Figura 1).

Em 2002, a doença foi constatada na Argentina; na Bolívia, em 2003; e no Uruguai, Colômbia e Estados Unidos em 2004.

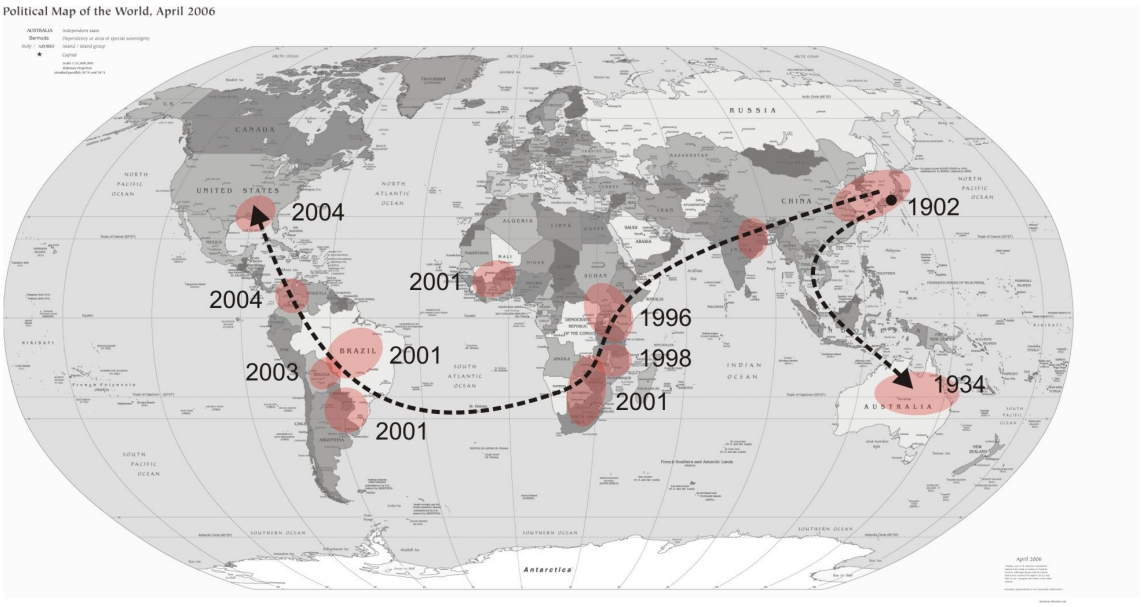

FIGURA. 1. Dispersão mundial do *P. pachyrhizi*. A seta mostra que o fungo originou na Ásia e se disseminou para todos os demais continentes.

3.3.2. Ferrugem asiática da soja e perdas econômicas

Há alguns anos, o aparecimento de doenças que traziam danos econômicos à cultura de soja era restrito a certas condições de clima e região geográfica. Entretanto, uma variedade de doenças causadas por bactérias, nematóides, vírus e fungos têm se tornado comum em diferentes regiões do Planeta (Hartman et al., 1999). Este fato ganha importância, quando se ressalta que o combate a pragas e doenças constitui-se nos principais fatores técnicos e financeiros limitantes ao cultivo econômico da soja. Neste contexto, destaca-se a ferrugem asiática da soja. Devido seu alto potencial destrutivo, é considerada uma das mais importantes dentre mais de 100 doenças, que afetam a cultura da soja, ameaçando-a seriamente em todo o mundo e limitando seu potencial de produtividade (Andrade & Araripe-Andrade, 2002; Panthee et al., 2007).

Significantes perdas de produtividade em culturas na Ásia, África, Oceania, América do Sul e em quase todos os países tropicais do Oriente têm ocorrido em consequência da ferrugem (Yorinori et al., 2005). Como exemplo, pode-se citar os prejuízos na Nigéria em 1999 (Akinsanmi & Ladipo, 2001), África do Sul e Paraguai em 2001, Argentina em 2002 (Yorinori & Paiva, 2002), Bolívia em 2003 (Yorinori et

al., 2005) e Estados Unidos em 2004 (Schneider et al., 2005), o que demonstra a importância deste fungo para a cultura da soja. Nestes países, os danos foram estimados em aproximadamente 30%, embora em diversas regiões tenham superado 50%. Elevadas perdas de rendimento têm sido registradas também na Austrália (80%), Índia (63%) e Taiwan (70%-80%) (Gupta et al., 1999). Ramteke et al. (2003) constataram perdas comparáveis às anteriores, também, na China.

No Brasil, reduções de produtividade de até 70% têm sido observadas. As regiões onde, a doença tem sido mais agressiva, têm variado de safra para safra, em função das condições climáticas. A severidade da doença, em algumas regiões, pode ser atribuída também ao fato de o fungo *P. pachyrhizi* possuir diversas raças com genes múltiplos de virulência (Sinclair & Hartman, 1999).

Assim, a única forma de controle atualmente é a utilização de fungicidas. Entretanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos pode ocasionar danos ao ambiente, levando ao desequilíbrio ambiental e à seleção de populações resistentes do fungo (Feng et al., 2005). Mesmo assim, a eficácia dos fungicidas, considerando-se a aplicação no momento correto, dura em média somente 25 dias (EMBRAPA, 2005).

Nenhuma região do mundo está livre da doença, pois, não existem variedades resistentes, nem fontes de resistência para uso imediato em programas de melhoramento (Schneider et al., 2006). Mesmo que houvesse fontes potencialmente resistentes, a durabilidade desta resistência ainda não poderia ser avaliada com segurança, uma vez que poucas informações sobre o fungo estão disponíveis até o momento.

3.3.3. Sintomatologia

Os primeiros sintomas da ferrugem são minúsculos pontos (no máximo 1 mm de diâmetro) mais escuros do que o tecido sadio da folha, e cuja coloração varia de esverdeada a cinza-esverdeada. Esses pontos aparecem na face inferior da folha, onde se observa a presença de pequenas protuberâncias (urédia), que se rompem, liberando os esporos hialinos (uredósporos) (Figura 2).

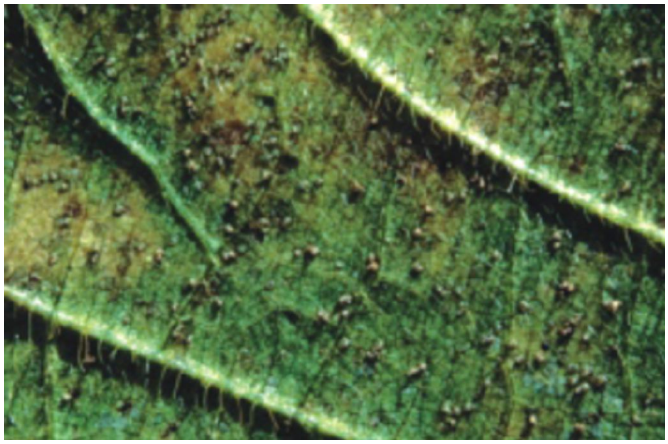

Figura 2. Urédias (Yorinori & Paiva, 2002).

Estas lesões tendem para o formato angular, podendo aparecer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta e em diversos órgãos, tais como pecíolos, vagens e caules (Sinclair & Hartman, 1999). Após serem expelidos pelas urédias, os uredósporos se acumulam ao redor dos poros e, posteriormente, são carregados pelo vento. O tecido da folha ao redor das urédias adquire coloração que varia de castanho-clara a castanho-avermelhada (Figura 3).

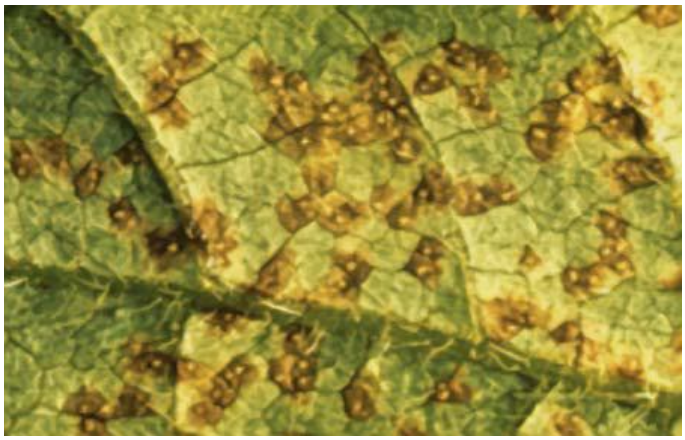

Figura 3. Lesões castanho-avermelhadas. (Agrios, 2004).

A infecção por *P. pachyrhizi* causa rápido amarelecimento ou bronzeamento e, posteriormente, a queda prematura das folhas. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho dos grãos e, consequentemente, maior a perda do

rendimento e da qualidade (Soares et al., 2004). Em casos severos, quando a doença atinge a soja na fase de formação das vagens ou no início da granação, pode causar o aborto e a queda das vagens, podendo resultar na perda total do rendimento (Yang et al.,1991). Em condições ótimas, as perdas na produtividade podem variar de 10% a 80%.

A doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento. A temperatura ótima para seu desenvolvimento varia entre 14 a 28 ºC, (Yorinori, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* foram coletadas em campos de produção de sete municípios brasileiros, conforme apresentado na Figura 4.

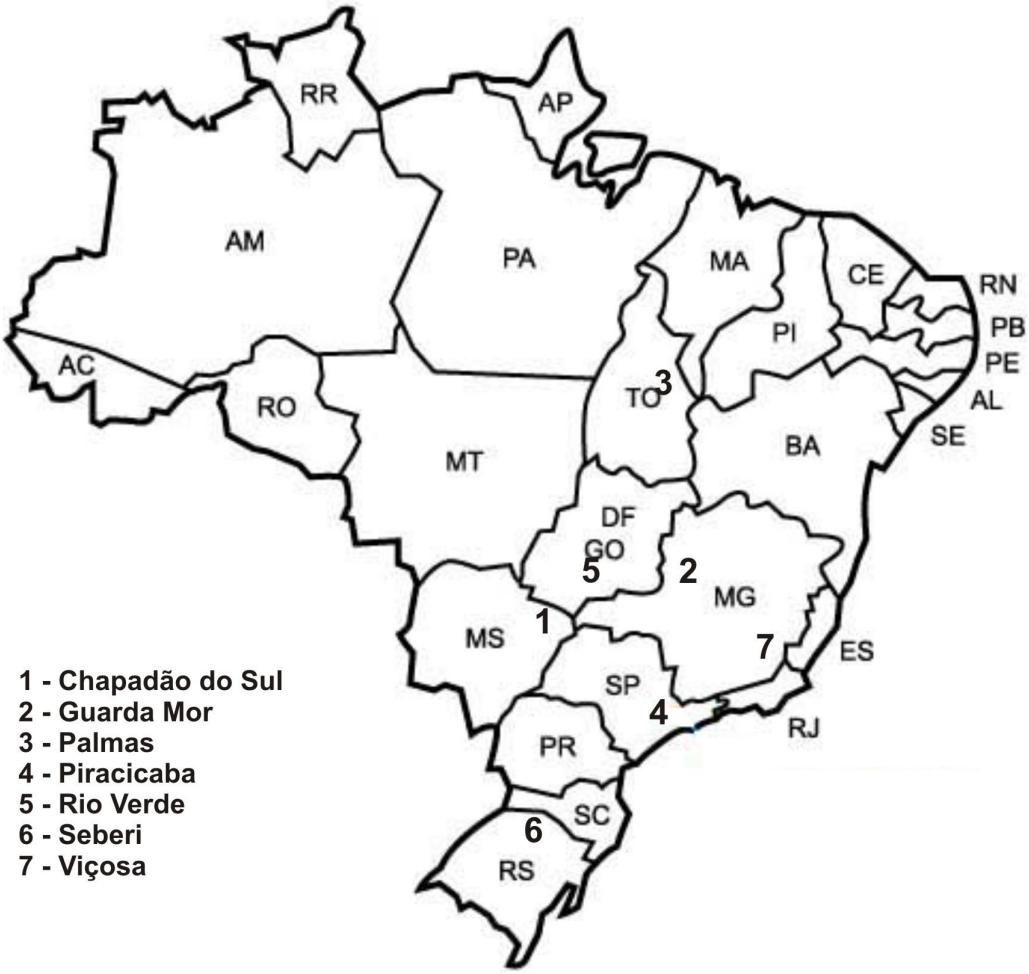

Figura 4. Os municípios onde foram coletadas as folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* estão numerados de 1 a 7.

As folhas infectadas foram embaladas e identificadas, antes de serem enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular II, localizado no Instituto de

Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, onde foi realizado todo o estudo. Após o recebimento, os esporos das folhas com maior severidade de doença foram removidos com auxílio de um pincel. Daquelas amostras que apresentavam pequena quantidade de esporos, pedaços das folhas com maior intensidade de lesão foram retirados. Esses materiais foram colocados em microtubos com capacidade de 2,0 ml. Em seguida, esses tubos foram identificados e o material neles contido foi liofilizado e armazenado a -80ºC, até serem utilizados para extração do DNA.

4.2. Extração do DNA total

Para a extração do DNA genômico total, utilizou-se o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Para cada amostra, foram utilizados aproximadamente 30 mg de esporos e,ou folhas infectadas. O material foi triturado em microtubos de capacidade de 1,5 ml, na presença de 600 µl de tampão de extração CTAB: NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; CTAB 5% (p/v); e β-mercaptoetanol 2% (v/v). O material foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 65ºC durante 15 minutos. Foram adicionados 400 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm em centrífuga 5415D (eppendorf), por 10 minutos, para separar a fase orgânica da aquosa. O sobrenadante foi transferido para microtubos de capacidade de 1,5 ml, onde foram adicionados 500 µl de isopropanol gelado. Em seguida, os tubos foram agitados e centrifugados a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado duas vezes com 500 µl de etanol 70% gelado. Os tubos foram deixados na câmara de fluxo laminar até que a água, contida em seus interiores, secasse completamente. O pellet foi, então, ressuspendido em 30 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo RNase (40 µg/ml) e, finalmente, armazenado à temperatura de -20ºC.

4.3. Teste de qualidade e quantificação do DNA

Retirou-se 1 μL do DNA ressuspendido em TE e, em seguida, adicionou-o a 4 μL de água ultrapura autoclavada e 1 μL de tampão de carregamento tipo IV (azul de bromofenol 0,25 % e sacarose 40 %). Os 6 μL resultantes para cada uma das amostras foram aplicados em gel de agarose 1 % e submetidos a 90 Volts, a fim de promover a migração do DNA no gel. Marcador de concentração foi utilizado, a fim de estimar as concentrações dos DNAs de *P. pachyrhizi* armazenados.

4.4. Desenho dos *primers*

A sequência de nucleotídeos do gene da β-tubulina de *Melampsora lini* (Ayliffe et al., 2001) foi usada como base para uma pesquisa no banco de dados do NCBI, visando identificar regiões do gene da β-tubulina de outros fungos filamentosos, que apresentassem elevada similaridade. Estas regiões seriam utilizadas para a construção de primers degenerados, que proporcionassem a amplificação do gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi*.

Surpreendentemente, durante a busca, foi encontrado um clone de *P. pachyrhizi* de 40837 nucleotídeos (AC 170158), contendo uma região com aproximadamente 80 % de identidade com o gene de β-tubulina de *M. lini.* .

Outros alinhamentos, considerando-se este mesmo gene, revelaram que a sequência de β-tubulina em basidiomicetos é altamente conservada. Assim, a região do clone de *P. pachyrhizi* com alta identidade foi utilizada no programa "Primer3 Input Program" (http://www.genome.wi.mit.edu//cgi-bin/primer/primer3.cgi) para o desenho dos *primers*.

Assim, dez *primers* foram desenhados, formando cinco combinações (1-2, 3-4, 5-6, 7-8 e 9-10), de forma a cobrir toda a região desejada do gene da β-tubulina (Figura 5).

Posteriormente, a eficiência desses *primers* foi testada, utilizando-se o programa *PrimerSelect* (DNASTAR, Madison, WI, EUA). Foram escolhidas combinações de *primers* que, em conjunto, possibilitassem a amplificação de todo o

gene em estudo. As condições ótimas de amplificação para cada par de oligonucleotídeos foram estabelecidas por meio de numerosos testes preliminares.

4.5. Amplificação das sequências

Amostras de DNA de *P. pachyrhizi,* coletadas em cada um dos campos de produção, foram extraídas e posteriormente utilizadas como molde para a amplificação do gene em estudo, empregando-se a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Um esquema mostrando as regiões do gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi*, onde ocorre o anelamento dos *primers* específicos, é apresentado na Figura 5.

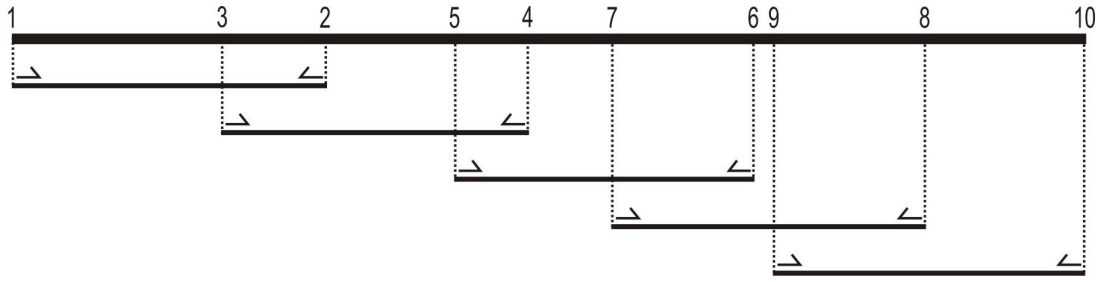

Figura 5. Esquema do anelamento dos *primers* no gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi*.

Finalizadas as amplificações, seus produtos foram aplicados em gel de agarose 0,8 %, acrescido de brometo de etídeo (0,25 µg/ml) e, posteriormente, foi feita a corrida eletroforética a 90 Volts em tampão TBE 1X (Tris-Borato 90,00 mM; EDTA 2mM). O tamanho dos fragmentos amplificados foi inferido por meio de comparações com marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Os fragmentos amplificados foram visualizados por meio de luz ultravioleta e arquivados sob forma de imagem digitalizadas, utilizando-se o EagleEye II (Stratgene).

4.6. Purificação dos produtos de PCR

Como etapa inerente ao sequenciamento, procedeu-se a purificação dos produtos de PCR. A purificação foi efetuada, empregando-se o kit ExoSap (USB Corporation), com exceção dos fragmentos amplificados pelo uso da 4º combinação de *primers*, utilizando-se as amostras de Guarda Mor (MG) e Piracicaba (SP), pois, neste caso, ocorreu o aparecimento de bandas inespecíficas no gel e, como não foi possível eliminá-las, os fragmentos amplificados foram purificadas a partir do gel, utilizando-se o kit de purificação de DNA da Qiagen.

4.6.1. Purificação com o kit ExoSAP-IT

Este protocolo funciona de forma enzimática, sendo utilizadas as enzimas EXOnuclease I e “Shrimp Alkaline Phosphatase”, que em conjunto dá nome ao kit. A primeira degrada o excesso de DNA fita simples (*primers*) e a segunda degrada nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR (dNTPs). O protocolo estabelece um volume de 2µl do kit para cada 5µl de produtos de PCR. Em seguida, as amostras contendo os 7µl, foram colocadas no termociclador por 15 minutos a 37ºC. Após o tratamento, ExoSAP-IT é inativado mediante exposição ao calor (80ºC por mais 15 minutos).

4.6.2. Purificação do DNA a partir do gel de agarose

Pedaços do gel contendo o DNA de interesse foram cortados com um bisturi limpo dentro do EagleEye II (Stratagene) e pesados, separadamente, em um microtúbulo previamente identificado. A purificação do DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito no kit Qia-quick (QIAGEN). O eluato contendo o DNA foi armazenado a -20ºC para ser, futuramente, sequenciado.

4.7. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA foi realizado por meio do método de terminação em cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs), utilizando-se o sequenciador automatizado “MegaBace DNA Analysis System 500” da AMERSHAM Biociences CORP, sendo empregados os mesmos *primers* utilizados na amplificação. O sequenciamento foi conduzido nas dependências do laboratório de Genômica, localizado no BIOAGRO.

As sequências obtidas para cada haplótipo foram editadas, utilizando-se o programa computacional *Sequencher* versão 4.1.4 e alinhadas com a introdução de *gaps* (quebra da continuidade da sequência de DNA), para compensar inserções e deleções de bases.

4.8. Análises de dados

As sequências completas de nucleotídeos do gene da β-tubulina dos sete isolados de *P. pachyrhizi*, encontradas neste trabalho, foram utilizadas para buscas de sequências similares em bancos de dados, usando-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na página do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov, acessado em jan. 2008). O alinhamento resultante dessas sequências foi usado, posteriormente, para verificar se *P. pachyrhizi* se alocava junto dos demais fungos causadores de ferrugens. Ressalta-se que a sequência de cada haplótipo foi o resultado da junção de dez regiões, sendo cinco obtidas da amplificação com o *primer foward* e cinco com o *reverse*, sendo excluídas regiões que se sobrepuseram e trechos terminais que não apresentaram boa qualidade.

As espécies, assim como os números dos acessos das sequências obtidas do banco de dados são especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies fúngicas e números dos acessos do GenBank para sequências de DNA e proteínas utilizadas neste trabalho

Espécie	Abreviação	nº do acesso (DNA)	nº do acesso (Proteína)
Aecidium brachycomes	Ab	DQ983201	
Aspergillus nidulans	An	M17519	
Blastocladiella emersonii	Be		ABK34895
Clone de Phakopsora pachyrhizi	Cp	AC170158	
Coprinus cinereus	Cc	AB000116	XP001838299
Cumminsiella mirabilissima	Cm	DQ983214	
Dietelia portoricensis	Dp	DQ983206	
Fusarium moliniforme	Fm	U27303	
Glycine max	Gm	AY907702	AAX86047
Laccaria bicolor	Lb		XP001883306
Lentinus sajor	Ls		AAD21093
Melampsora lini	Ml	AF317682	Q9HFQ3
Miyagia pseudosphaeria	Mp	DQ983202	
Phakopsora apoda	Pa	DQ983197	
Phragmidium barnardii	Pb	EF570793	
Pleurotus sajor-caju	Ps	AF132911	AAD21093
Puccinia psidii	Pp	EF570828	
Schizophyllum commune	Sc	X63372	P30668
Suillus bovinus	Sb		Q6EVK8
Uredo dianellae	Ud	EF570847	
Uromyces fabae	Uv	AJ311552	Q96TU8
Uromycladium maritimum	Um	EF570792	

Os programas computacionais utilizados para alinhamento e construção da árvore filogenética foram, respectivamente, o ClustalW (Thompson et al., 1994) e o MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). De posse do alinhamento, a árvore filogenética foi construída, utilizando-se o método de distância de *neighbor-joining* (*NJ*) (Saitou & Nei, 1987), com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, considerando-se, apenas, as regiões do gene que apresentaram máxima identidade para todas as sequências analisadas. Este modelo foi escolhido, após verificar que o número de transversões foi maior do que o esperado, considerando-se a sequência de nucleotídeos em estudo.

O método *NJ* se baseia na união de duas espécies que, além de estarem próximas umas das outras, também estejam conjuntamente, distantes do restante das espécies. Este método é utilizado a fim de minimizar a soma dos tamanhos de todas as arestas da árvore. Assim, se duas espécies são designadas como vizinhas e são ligadas, uma nova espécie combinada é criada, sendo que as espécies agrupadas são retiradas da matriz. O número de espécies é reduzido de um e o procedimento é novamente aplicado, para encontrar novos vizinhos. O ciclo se repete até que o número de espécies se torne igual a dois.

A robustez dos nódulos da árvore foi testada, por meio da metodologia de *bootstrap* com 5.000 réplicas, utilizando o programa *MEGA*, versão 4 (Tamura et al. 2007). O procedimento *bootstrap* consiste na reamostragem de mesmo tamanho e com reposição (*bootstrapping*) do conjunto de dados da amostra original. Dessa forma, todo resultado *bootstrap* depende, diretamente, da amostra original.

Sequências de aminoácidos, correspondentes ao gene da β-tubulina obtido neste trabalho, também foram alinhadas, utilizando-se a ferramenta BLAST, com sequências protéicas correspondentes a β-tubulina de Uredinales obtidas do GenBank. Este alinhamento foi usado, posteriormente, para construção da árvore filogenética, pelo uso do método de NJ.

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização do gene da β-tubulina de *Phakopsora pachyrhizi*

O gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* sequenciado apresentou 2815 pb, sendo sua ORF constituída de 1341 pb. Do restante, 452 pb correspondem à região promotora e 234 pb pertencem à extremidade 3' não traduzida. Foram localizados, ainda, os códons de início (ATG) e final (TAG) da tradução (Figura 6).

A verificação da presença de sítios consenso franqueadores dos íntrons e comparações da sequência de aminoácidos predita neste trabalho com sequências de β-tubulina de outros fungos relacionados foram necessárias para confirmação da região codificadora.

Estão presentes, na região promotora, os sinais típicos envolvidos com o início da transcrição, sendo identificadas três possíveis sequências TATA Box (situadas a -176, -320 e -386 pb em relação ao códon de iniciação) e cinco possíveis sequências CAAT Box (situadas a -350, -269, -237, -229 e -92 pb em relação ao códon de iniciação) (Figura 6). Um domínio de 30 nucleotídeos, constituído por citosina e timina, está contido na região promotora entre os pares de bases -205 e -175 upstream ao códon de inicio da tradução. Esta região rica em pirimidinas é encontrada na região promotora de muitos genes de fungos filamentosos e está, frequentemente, associada com sítios de início da transcrição (Ballance, 1986; Cooley & Caten, 1993) (Figura 6).

A sequência consenso AATAAA, que participa da formação e poliadenilação do mRNA precursor em eucariotos superiores, também aparece no gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* a 44 pb *downstream* do códon de terminação TAG. Esta sequência representa um sinal de clivagem, que é reconhecido por uma endonuclease específica (Poli A polimerase), que tem como função a adição de 100 a 200 resíduos de adenina, formando, assim, a cauda poli (A). Acredita-se que esta estrutura esteja envolvida com o tempo de vida do mRNA maduro.

O gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* apresentou um conteúdo GC de aproximadamente 53%.

Foi encontrada pouca variabilidade genética no gene da β-tubulina nos sete isolados de *P. pachyrhizi* sequenciados neste trabalho. Esses sítios polimórficos estão localizados nas posições -50, 231, 323 e 1580, sempre aparecendo fora dos éxons (letras brancas com fundo preto na Figura 6). Este fato pode ser explicado em razão da elevada conservação deste gene em fungos filamentosos e, ainda, por este fungo ter chegado recentemente ao Brasil.

```
TCCCCTTCATCCTGTTACTCTGTTCCTGACAGACCTAACTCTACTGTCTAACTACATCCA    -393
GACAGTTATATATCTAGTATCTAACAGAACCCTACCTGGACACAATCTTCTGAGTCTCAG    -333
TCTCAGACGAGTTATAAGGTAGTCTCATCTGGCAGAGGCTATGATTTGTTGTTTAACCTA    -273
CCTCAATCTTCCACCCTTGACTCTATCCTTCTATGCAATCTCTCAATCAGGGCTGGCTGA    -213
CACAGAGCTTTTCTTTCTTTTTTCTTTTTCTTTCTTTATAAACACCGATCGTGGTACTCG    -153
TCCTCCAAAGTGTCAGTCAAACTCATCTACTGATTCATCCTGTGGTACGATATCTAACAT     -93
CAATCTGTTCTTTTTATTCCATGAATGATGAAATCGTTTAGTRAACATTCATAAAAGCAT     -33
ATTTATTTAATAATAATAAGACTCTTTTCATCATGAGAGAAATTGTGTAAGTGTTCCACT      28
                                METArgGluIleVa
                                +1           5
AAGACTTAAACCCGATCATTTTTATCCAGAACAAGAACAGTTACAGTGGAGCAGGATCTG      88
                             IVS I
GTCAAATTGTTCATGTTTTTTGTTTTTTGTTTTAAAAAATGATCGAAACAGTCATCTTCA     148
                                                   lHisLeuGl
                                                      6
GACTGGTCAAGTAAGTCTATTTTTCTTGTTCTTTGCAATACTTCTTAAATAGTTGATCTG     208
NThrGlyGln                   IVS II
        11
ACGTCAGGAACTGTATCTGTCAMTAGTGTGGTAACCAAATCGGTATGTGGGAAGCACCTT     268
                          CysGlyAsnGlnIleG
                           12          16
GAAGTTTAGATTTAAATATGCTATGGAGTGCTGCACTAACGGTCAACTTTCATTYCTCTC     328
                             IVS III
GATCACAGGTGCCAAGTTCTGGGAAGTTGTCTGTGATGAGCATGGAATCGCTACTGACGG     388
        lyAlaLysPheTrpGluValValCysAspGluHisGlyIleAlaThrAspGl
           18
ACAGTGAGTGATCTGAAGCTTTTTTTATTTTTTATTTTTATTTTATTTTTTTTACTGAT     488
yGl                          IVS IV
 35
ATCCTCTGAGACCGTCTAAATCATCAATTGTTTCATCTCGATCAGGTACAAGGGAACAAC     508
                                             nTyrLysGlyThrTh
                                               36
CGATCTTCAACTGGAAAGAATCAGTGTTTACTACGTAAGGCCAGATTACTTCTTCATACA     568
rAspLeuGlnLeuGluArgIleSerValTyrTyr
                                51
AATTCTCTAAGCCAAGCTCGCTGAACATCATTCTCTCGTAACGCTTCTTCTATTCTCAGA     628
                             IVS V                          A
ATGAGGTTGCTGCCAACAAGTATGTACCCCGTGCAGTTTTGATTGATTTGGAACCAGGAA     688
snGluValAlaAlaAsnLysTyrValProArgAlaValLeuIleAspLeuGluProGlyT
               57                            67
```

Figura 6. Gene representativo da β-tubulina de *P. pachyrhizi* com sua correspondente sequência de aminoácidos. A sequência de nucleotídeos é numerada começando pela primeira base do códon de iniciação ATG (+1), e os números na margem direita representam a posição do último nucleotídeo de cada linha em relação ao códon de iniciação. Os oito íntrons (sequências intervenientes [IVS]) estão indicados. Sítios 5' e 3', relacionados ao mecanismos de *splicing* estão sublinhados em todos os íntrons. Sinais típicos envolvidos com o início da transcrição de eucariotos (ex: TATAA, CAAT, e motivos CT) estão em negrito na região 5' não codificante. Duplo sublinhado a 3' do códon de terminação (TAG) mostra um potencial sítio de poliadenilação. Os códons de início e final da tradução estão hachurados em cinza escuro e os éxons hachurados em cinza claro. As letras brancas com fundo preto correspondem aos sítios variáveis, sendo R = G ou A, M = C ou A, Y = C ou T, e B representa uma deleção.

Figura 6, Continua.

```
CCATGGATTCGGTTCGATCCGGGACTTTTGGATCCCTTTTCAGACCTGATAACTTTGTAT      748
hrMetAspSerValArgSerGlyThrPheGlySerLeuPheArgProAspAsnPheValP
                77                                  87
TTGGTCAATCTGGTGCCGGTAACAACTGGGCCAAAGGACATTACACTGAGGGAGCTGAAC      808
heGlyGlnSerGlyAlaGlyAsnAsnTrpAlaLysGlyHisTyrThrGluGlyAlaGluL
                97                                 107
TGGTAGACTCGGTCCTTGACGTAGTCCGAAAGGAGGCTGAGGGGTGTGACTGCCTCCAGG      868
euValAspSerValLeuAspValValArgLysGluAlaGluGlyCysAspCysLeuGlnG
               117                                 127
GCTTTCAAATCACCCACTCGCTTGGGGGTGGTACAGGAGCTGGAATGGGTACTTTGCTAA      928
lyPheGlnIleThrHisSerLeuGlyGlyGlyThrGlyAlaGlyMetGlyThrLeuLeuI
               137                                 147
TCTCCAAGATTAGGGAAGAGTTTCCGGATCGTATGATGGCAACCTTCTCCGTGGTCCCAT      988
LeSerLysIleArgGluGluPheProAspArgMetMetAlaThrPheSerValValProS
               157                                 167
CCCCCAAGGTCTCTGACACCGTTGTCGAACCCTACAATGCGGTTCTCTCGGTCCATCAGC     1048
erProLysValSerAspThrValValGluProTyrAsnAlaValLeuSerValHisGlnL
               177                                 187
TCGTTGAAAACTCGGATGAGACGTTCTGTATCGACAATGAGGCACTTTATGAGATCTGCT     1108
euValGluAsnSerAspGluThrPheCysIleAspAsnGluAlaLeuTyrGluIleCysP
               197                                 207
TCCGTACCCTCAAACTCGCAACTCCTACCTATGGTGACCTGAACCACCTCGTTTCGATCG     1168
heArgThrLeuLysLeuAlaThrProThrTyrGlyAspLeuAsnHisLeuVALSerIleV
               217                                 227
TTATGAGCGGTATTACCACCTGTCTTCGTTTCCCCGGTCAACTCAACTCCGATCTACGAA     1228
alMetSerGlyIleThrThrCysLeuArgPheProGlyGlnLeuAsnSerAspLeuArgL
               237                                 247
AACTTGCCGTCAACATGGTCCCTTTCCCGCGATTGCACTTTTTCATGGTTGGATTTGCGC     1288
ysLeuAlavalAsnMetValProPheProArgLeuHisPhePheMetValGlyPheAlaP
               257                                 267
CACTCACTGCTCGCGGCAGTCAGCAGTACCGTGCGATCACCGTCCCGGAGCTGACCTCCC     1348
roLeuThrAlaArgGlySerGlnGlnTyrArgAlaIleThrValProGluLeuThrSerG
               277                                 287
AGATGTTTGATGCAAAGAACATGATGGCTGCCTCTGATCCGAGACACGGACGTTACCTGA     1408
lnMetPheAspAlaLysAsnMetMetAlaAlaSerAspProArgHisGlyArgTyrLeuT
               297                                 307
CTGTGGCAGCTTATTTCAGGGGTAAAGTATCGATGAAGGAGGTTGAGGAGAACATGCTCT     1468
hrValAlaAlaTyrPheArgGlyLysValSerMetLysGluValGluGluAsnMetLeuS
               317                                 327
CAGTACAGAGCAAGAACTCTAACTATTTTGTCGAATGGAGTGAGTAACAAATCGGTTTCT     1528
erValGlnSerLysAsnSerAsnTyrPheValGluTrpI
               337                   344
GCTGTTATTTCCAGTAGTGTATTTTGTGGGATTGCCTAACCGTTTTTTTTTBGCTGTTTC     1588
                                IVS VI
TAGTTCCAAACAATGTCCAGACCGCCCACTGTGACATTGCTCCAAGGGCTCACAAGATGT     1648
   leProAsnAsnValGlnThrAlaHisCysAspIleAlaProArgAlaHisLysMetS
               349                                 359
CTGTGACGTTTATTGGAAACTCGACCGCTATCCAAGATCTGTTCAAGCGAGTGGCAGATC     1708
erValThrPheIleGlyAsnSerThrAlaIleGlnAspLeuPheLysArgValAlaAspG
               369                                 379
```

Figura 6, Continua.

```
AATTCACGGCCATGTTTAGGCGTAAAGCTTTCTTGCACTGGTACACTGGTGAAGGGTAGG    1768
lnPheThrAlaMetPheArgArgLysAlaPheLeuHisTrpTyrThrGlyGluGl
              389                             399      402
TGTTTTTATTTATTCATACGCCCATGGGGCATTTCAATTTATGGCTTTTTTCTTGAAAAA    1828
                                IVS VII
AAGTTTCATTAACTAACTTTGAGTTTAAAAATAGAATGGATGAAATGGAATTCACAGAGG    1888
                                   yMetAspGluMetGluPheThrGluA
                                             406
CTGAGTCCAACGTGCAAGATCTGATTGCAGAATACCAGCAATACCAGGAAGCTCATATGG    1948
laGluSerAsnValGlnAspLeuIleAlaGluTyrGlnGlnTyrGlnGluAlaHisMetG
              416                             426
AGGAGGAAGATGGTGATGAGGTTTATGAGGATGAGGTATGTTTTTAGACAAAAATTACAT    2008
luGluGluAspGlyAspGluValTyrGluAspGlu
              436               442
GAAAATATATCTACTAATAATTGAAGCTTTTTTGGCTTGGTCACTTATTTATCTATTCTT    2068
                                IVS VIII
CCATTAACTCCTTCCATTTTTATTGTGTTAAAACCAAAAATAGCCCCTTCCAGAAGAGTA    2128
                                            ProLeuProGluGluEN
                                            443         447
GAAGCTGAATCTGGAATTAGAGTTGTGAGAATCATGGTAAAGGAGAATAAATAATAATCA    2188
D
TAAAAAAATCTTTACAAAATTTTGATGCAATAGTACTTTTTTTAATCATTTTTATTTATT    2248
TTTTTTTAAAAAAAAATTGCAAGCCCTGATCTTCCAAATCCTTTTTTATCTTTACTTAAG    2308
AAACTTTTTTTTTACTATTCCTGTTTGCAATTTGCTTTTTTTTTCCTTTGGGTTG         2363
```

Figura 6, Conclusão.

Neste gene, estão presentes oito sequências intervenientes não-codificantes (íntrons) de 125, 76, 86, 102, 85, 84, 99 e 128 pb, respectivamente (Figura 7). Sítios envolvidos no mecanismo de *splicing* foram encontrados flanqueando os oito íntrons, sendo o sítio GT(A/G)NGT encontrado na extremidade 5' e o sítio (C/T)AG encontrado na extremidade 3' (Figura 6). Sequências semelhantes foram encontradas por Gurr et al. (1987), estudando fungos filamentosos.

Na análise da sequência nucleotídica do gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi,* constata-se que o mesmo contém nove éxons, que têm, 14, 19, 16, 55, 49, 880, 172, 121 e 15 pb, respectivamente (Figura 7).

Este é o primeiro gene completo da β-tubulina e a primeira proteína completa a ser caracterizada neste fungo. A identificação deste gene, que está potencialmente envolvido em muitas funções celulares em *P. pachyrhizi*, pode abrir caminho para a elucidação de características funcionais de β-tubulina.

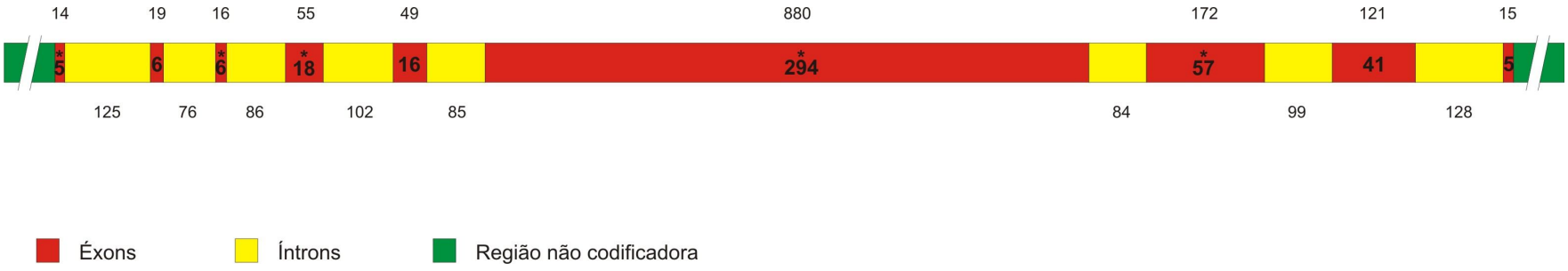

Figura 7. Diagrama esquemático do gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi*. Os números acima e abaixo do gene representam o tamanho dos éxons e íntrons, respectivamente. Os números dentro do diagrama representam os números de aminoácidos codificados pelos éxons, sendo que o asterisco acima desses números indica que o último códon do respectivo éxon é interrompido por uma sequência interveniente (íntron).

5.2. Análise comparativa da sequência protéica de β-tubulina

O gene sequenciado codifica uma proteína de 446 aminoácidos, os quais foram alinhados com sequências de aminoácidos de β-tubulina de outros fungos relacionados, pelo uso do algoritmo Clustal. Em geral, o resultado deste alinhamento revelou grande similaridade entre a sequência de aminoácidos da proteína predita de *P. pachyrhizi* e as outras sequências obtidas do GenBank (Figura 8).

A sequência de aminoácidos predita de *P. pachyrhizi* é 98% idêntica a tub1 de *Uromyces viciae-fabae*, 96% idêntica a tub1 de *Melampsora lini*, 90% idêntica a tub1 de *Coprinopsis cinerea*, 90% idêntica a tub1 de *Laccaria bicolor*, 89% idêntica a tub1 de *Lentinus sajor-caju*, 89% idêntica a tub1 de *Schizophyllum commune* e 89% idêntica a tub1 de *Suillus bovinus*. Estes altos graus de similaridade demonstram que a sequência de aminoácidos desta proteína é, altamente, conservada entre os diferentes reinos dos seres vivos.

Na busca por domínios, usando a sequência de aminoácidos de β-tubulina de *P. pachyrhizi*, identificou-se que esta proteína possui quatro domínios altamente conservados, sendo eles: domínio de ligação a nucleotídeos (exposto na superfície da molécula), domínio de ligação ao taxol, domínio de interface alfa/beta e domínio de interface beta/alfa. Estes domínios são representados, na Figura 8, pelas cores turquesa, vermelho, verde e amarelo, respectivamente. A cor cinza representa regiões pertencentes tanto ao domínio de interface alfa/beta quanto ao domínio de interface beta/alfa. A análise desta figura revela que as regiões da proteína correspondentes aos quatro domínios são, altamente, conservadas.

Uma explicação para a conservação destes domínios é que mudanças neles acarretariam alteração na superfície dos microtúbulos, impedindo, assim, a interação destes com outras moléculas fundamentalmente importantes no equilíbrio das funções celulares (Downing, 2000). Outra explicação é que mutações neste gene, que possam resultar em modificação favorável para sua interação com uma determinada proteína, podem ocasionar modificações extremamente desfavoráveis para a interação com outras proteínas, que se ligam em regiões próximas a este sítio. Vários estudos têm demonstrado que a tubulina interage, diretamente, com dezenas de outras proteínas. Assim, com o passar do tempo, os organismos em

evolução mantiveram constante a estrutura da tubulina e alteraram seus companheiros de ligação.

No entanto, existe uma região da β-tubulina (compreendida entre os aminoácidos 328 e 450 da Figura 8), que apresenta alta variabilidade e, como previsível, nenhum dos domínios mencionados acima pertencem a esta região. Wolfgang et al. (2004) identificaram esta região, trabalhando com organismos multicelulares e concluíram que esta variabilidade concentrava-se em aminoácidos situados na região C-terminal, a qual é responsável pela formação de um sulco na superfície do microtúbulo. Assim, a diversidade entre as isoformas de tubulina parece afetar, principalmente, a associação de proteínas acessórias com a superfície do microtúbulo e não a polimerização do microtúbulo em si.

A sequência de aminoácidos da β-tubulina de *Glycine max* foi incluída nesta análise, a fim de verificar se houve contaminação do DNA extraído dos fungos com DNA proveniente da soja. O resultado deste alinhamento revela baixa identidade entre a sequência de aminoácidos da β-tubulina de *Glycine max*, em comparação com a sequência de aminoácidos da β-tubulina dos demais fungos filamentosos envolvidos nesta análise. Portanto, evidencia-se que não houve contaminação do DNA de *P. pachyrhizi* durante a extração.

```
Pp    MREIVHLQTGQCGNQIGAKFWEVVCDEHGIATDGQYKGTTDL--Q    45
Uv    ......................S.............N...--.    45
Ml    ......................S..............S..--.    45
Cc    ......................S.....ER..L...NN..--.    45
Lb    ......................S.....ER..L...NN..--.    45
Ps    ......................S.....EP..L...NN..--.    45
Sc    ......................S.....EA..L....N.Q--.    45
Be    ......................S.....EP..L...NN..--.    45
Sb    ......I...............S.....ER..L....N.M--.    45
Ls    ...........R..........S.....EP..L...NN..--.    45
Gm    ....ISIHI..A.I.V.NSC..LY.L....QP..MMPSDSTFGVA    45
```

```
Pp    LERISVYYNEVAANKYVPRAVLIDLEPGTMDSVRSGTFGSLFRPD    90
Uv    ...........................................A........    90
Ml    ............G..........................P........    90
Cc    ..........IG.S........V..............PL.......    90
Lb    ..........IG..........V..............PL.G.....    90
Ps    ...........G..........V..............PL.......    90
Sc    ..........IG........I.V..............PL.G.....    90
Be    ...........G..........V..............PLA......    90
Sb    ..........IGS.........V..............PL.G.....    90
Ls    ...........G..........V..............PL.......    90
Gm    HDAFNTFFS.TGSG.H.... .FV....TV.E..C..YRQ..H.E    90
```

```
Pp    NFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKEAEGCDCLQGF    135
Uv    ........................................    135
Ml    ........................................    135
Cc    ........................................    135
Lb    ........................................T.....    135
Ps    ......................A...........T.....    135
Sc    ......................A...........T.....    135
Be    ......................A...........T.....    135
Sb    ..I.....................................T.....    135
Ls    ........G...............A...........T.....    135
Gm    QLIS.KED.A..F.R....V.K.I..LC..R...L.DN.TG....    135
```

Figura 8. Análise comparativa de sequências. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida para a proteína β-tubulina de *P. pachyrhizi* (primeira linha) com outras sequências codificadoras de β-tubulina de outros fungos relacionados, obtidas do GenBank. Os aminoácidos estão representados pelo código de uma letra. Aminoácidos conservados estão indicados por ponto (·). Os traços representam *Gaps*, que foram introduzidos para obtenção de máxima identidade entre as sequências. Esta proteína apresenta quatro domínios conservados: domínio de ligação a nucleotídeos (turquesa), domínio de ligação ao taxol (vermelho), domínio de interface alfa/beta (verde) e domínio de interface beta/alfa (amarelo). A cor cinza representa regiões pertencentes tanto ao domínio de interface alfa/beta quanto ao domínio de interface beta/alfa. O significado das abreviações e os números de acesso destas sequências no GenBank estão especificados na Tabela 1.

Figura 8, continua.

```
Pp    QITHSLGGGTGAGMGTLLISKIREEFPDRMMATFSVVPSPKVSDT    180
Uv    ..........................................    180
Ml    ..........................................    180
Cc    ..........................Y.....C.Y..........    180
Lb    ..........................Y.....C.Y..........    180
Ps    ..........................Y.....C.Y..........    180
Sc    ..........................Y.....C............    180
Be    ..........................Y.....C.Y..........    180
Sb    ..................M......Y.....C.Y......A....    180
Ls    ..........................Y.....C.Y..........    180
Gm    LVFNAV.....S.L.S..LERLSVDYGKKSKLG.TIY...Q..TA    180

Pp    VVEPYNAVLSVHQLVENSDETFCIDNEALYEICFRTLKLATPTYG    225
Uv    .......T.......................D.............    225
Ml    .......T.......................D........Q.....    225
Cc    .......T.......................D........S.....    225
Lb    .......T.......................D........S.....    225
Ps    .......T.......................D........T.....    225
Sc    .......T.......................D........S.....    225
Be    .......T.......................D........T.....    225
Sb    .......T.......................D........S.....    225
Ls    .......T.......................D........T.....    225
Gm    ......S...T.S.L.HT.VAVLL....I.D..R.S.DIER...T    225

Pp    DLNHLVSIVMSGITTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLHFFMV    270
Uv    ..........................................    270
Ml    ..........................................    270
Cc    ..........................................T    270
Lb    ..........................................T    270
Ps    .....I.....................................P    270
Sc    .......F.......S.................L..........T    270
Be    .....I.....................................P    270
Sb    .......FG..................................T    270
Ls    .....I.....................................P    270
Gm    N..R.I.QII.SL..S...D.AI.V.ITEFQT.L..Y..I..MLS    270

Pp    GFAPLTARGSQQYRAITVPELTSQMFDAKNMMAASDPRHGRYLTV    315
Uv    ..........................................    315
Ml    ...............V..............................    315
Cc    ..........A....V......Q.......................    315
Lb    ...............V......Q.......................    315
Ps    ...............V......Q.......................    315
Sc    ...............V......Q.......................    315
Be    .LC............V......Q.......................    315
Sb    ...............V......Q.......................    315
Ls    .VC............V......Q.......................    315
Gm    SY..VISAAKAYHEQLS...I.NAV.EPAS...KC.....K.MAC    315
```

Figura 8, continua.

```
Pp    AAYFRGKVSMKEVEENMLSVQSKNSNYFVEWIPN----NVQTAHC     360
Uv    ..........N.........----.......                   360
Ml    ..........................----.......             360
Cc    ..V.....Q.QN..N...A.....-----..L..Q.              360
Lb    ..V.....Q.QN..N...A.....-----..L..Q.              360
Ps    ..V.....Q.QN..N...A.....-----..L..Q.              360
Sc    ..M.....Q.QN..N...A.....-----..LASQ.              360
Be    ..V.....Q.QN..N...A.....-----..L..Q.              360
Sb    ..V.....Q.QN..N...A.....-----..LS.Q.              360
Ls    ..V.....Q.QN..N...A.....-----..L..Q.              360
Gm    CLMY..D.VP.D.NAAVATIKT.RTVQ..D.C.TGFKCGINYQPP     360


Pp    DIAPRA----HKMSVTFIGNSTAIQDLFKRVADQFTAMFRRKAFL     405
Uv    .....----.................................        405
Ml    .....G----L..................I.............       405
Cc    ..P..G----L..A...L.......E.....S.......K.....      405
Lb    ..P..G----L..A...L.......E.....S.......K.....      405
Ps    ..P..G----C..A...L.......E.....N...A...K.....      405
Sc    .....G----LR.....L.......E.....S.......K.....      405
Be    ..P..G----C..A...L.......E.....N...A...K.....      405
Sb    ..P..G----V..A...L.......E.....S.H.....K.....      405
Ls    ..P..G----C..A...L.......E.....N...A...K.....      405
Gm    SVV.GGDLAKVQRA.CM.S.N..VAEV.S.IDHK.DL.YAKR..V     405


Pp    HWYTGEGMDEMEFTEAESNVQDLIAEYQQYQEAHMEEEDG-DEVY     450
Uv    ...................M...V...........DD.EA-E.A.      450
Ml    ...................M...V..........VD.DEVDE...      450
Cc    ....Q..............M...V.......D.TV...-.---E.      450
Lb    ....Q..............M...V.......D.TV...-.---E.      450
Ps    ....Q..............M...V.......D.TAD..E.---E.      450
Sc    ....Q..............M...V.......D.TV...-.---E.      450
Be    ....Q..............M...V.......D.TAD..E.---E.      450
Sb    ....Q..............M...........D.TV...-A---E.      450
Ls    ....Q..............M...V.......D.TAD..E.---E.      450
Gm    ...V....E.G..S..REDLAA.EKD.EEVGAEGA.DDEE-----      450


Pp    EDEPLPEE--                                         460
Uv    ...AP...--                                         460
Ml    ...AP...--                                         460
Cc    ...V.ED.Q-                                         460
Lb    .E.LPA..DQ                                         460
Ps    .E..AE..Q-                                         460
Sc    .E.VIEDQE-                                         460
Be    .E..AE..Q-                                         460
Sb    .E.VPAD.ES                                         460
Ls    .E..AE..Q-                                         460
Gm    GEDYS-----                                         460
```

Figura 8, conclusão.

5.3. Árvore filogenética com base no gene da β-tubulina

A árvore filogenética foi obtida baseando-se no alinhamento da sequência parcial codificadora do gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* com outras 12 sequências nucleotídicas deste mesmo gene de outros fungos filamentosos, obtidas do GenBank. Para o alinhamento, duas outras sequências deste mesmo gene (uma de *Glycine max* e a outra de *Coprinus cinereus*), foram, ainda, utilizadas com dois propósitos: verificação da proximidade entre *P. pachyrhizi e Glycine max* (baseando-se na alocação destas espécies); e enraizamento da árvore. Para algumas das espécies analisadas, encontrou-se no banco de dados mais de uma sequência codificadora da β-tubulina, sendo escolhida aquela que apresentava maior número de aminoácidos codificados.

As espécies foram alocadas em um só grupo, sendo este composto exclusivamente por basidiomicetos pertencentes à ordem *Uredinales* (em negrito na Figura 9). Conforme esperado, *P. pachyrhizi* foi alocado junto aos demais fungos causadores de ferrugens, comprovando, assim, que a sequência codificadora da β-tubulina deste patógeno apresenta alta similaridade, em comparação com sequências correspondentes dos demais fungos.

As espécies de *Glycine max* e *Coprinus cinereus* foram efetivamente, separadas das demais espécies utilizadas nesta análise, o que reforça o argumento de que não houve contaminação do DNA de *P. pachyrhizi* com DNA de soja, durante a extração do material genético de *P. pachyrhizi*.

Foi gerada também uma árvore filogenética, baseando-se na sequência de aminoácidos da β-tubulina usando o método NJ. Entretanto, devido ao menor grau de informação apresentada por esta molécula, não foi possível a separação das espécies, levando à formação de uma politomia. Conclui-se então que a sequência de aminoácidos desta proteína não é adequada para análises filogenéticas em nível de espécies. Este fato é explicado em razão da alta conservação desta proteína, que pouco se alterou devido às funções cruciais que desempenha nas células.

Foram construídas árvores filogenéticas, utilizando-se três outros métodos implementados no MEGA (Evolução mínima, Máxima parcimônia e WPGMA), a fim de confirmar os resultados obtidos por meio da metodologia *neighbor-joining*. Pequenas alterações na alocação das espécies ocorreram, mas a topologia da

árvore mostrou que as alocações das espécies em um clado único não foram alteradas.

Muitas moléculas têm sido utilizadas para estudos filogenéticos em espécies de fungos. Entretanto, nem todas as moléculas possuem igual valor na análise de eventos evolutivos e nas relações filogenéticas. Segundo Zhou & Kleinhofs (1996), a molécula a ser utilizada deve ser, suficientemente, grande e consistir de um número razoável de unidades funcionais, as quais de alguma forma devem ser independentes umas das outras no sentido evolutivo. Baseando-se nestas especificações e tendo por base a separação de espécies muito próximas evolutivamente, pode-se dizer que a sequência de nucleotídeos do gene da β-tubulina pode ser empregada em estudos de evolução molecular de espécies de fungos filamentosos.

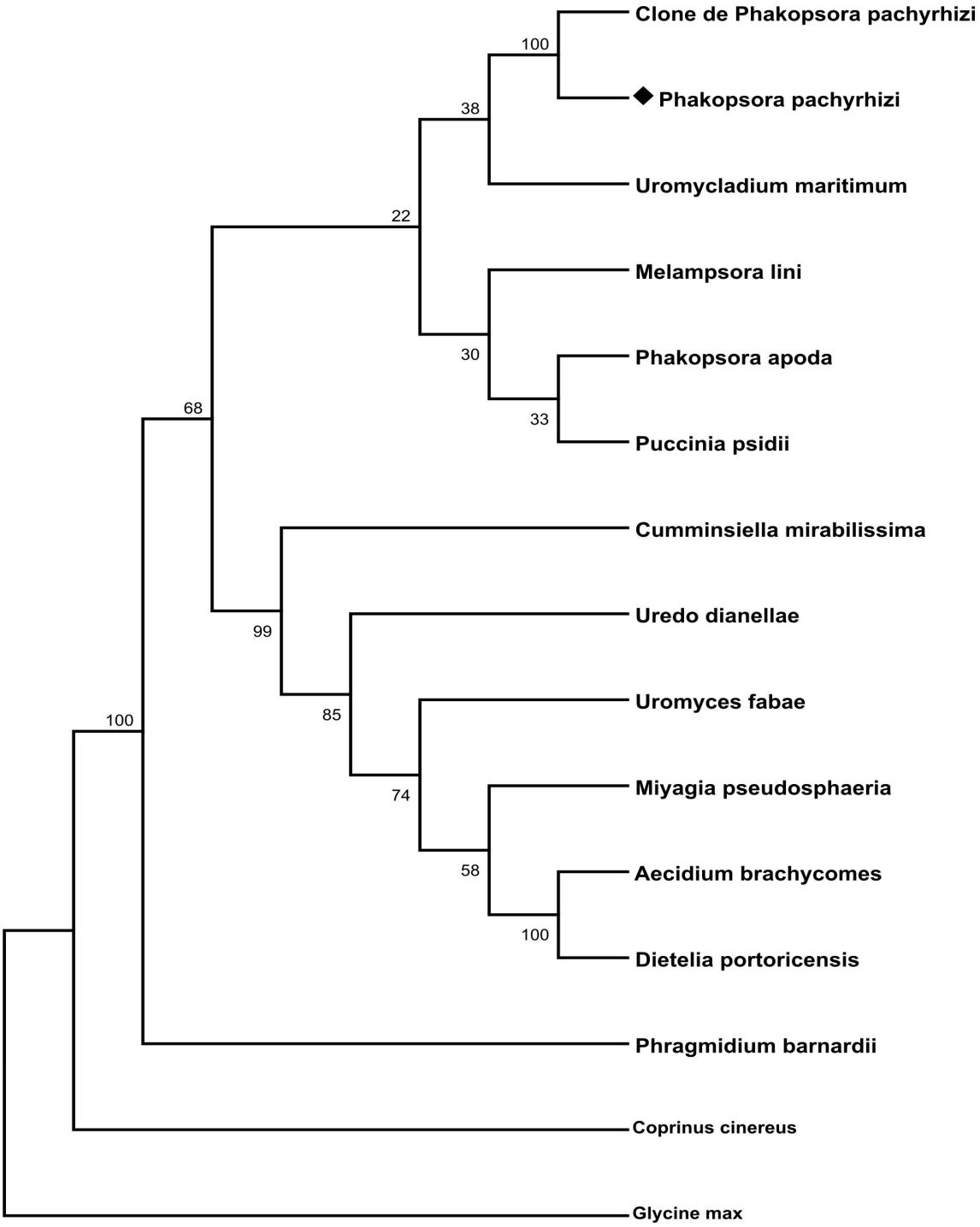

Figura 9. Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento da sequência parcial do gene codificador da β-tubulina de *P. pachyrhizi* com nucleotídeos do mesmo gene de outros fungos filamentosos. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre as espécies. A árvore enraizada foi obtida usando o método NJ implementado no programa MEGA (versão 4). Os números próximos aos ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas, com base em 5.000 replicatas. *P. pachyrhizi* está indicado por um losango (♦). Os números dos acessos do GenBank para sequências de DNA utilizadas neste trabalho estão especificados na Tabela 1.

5.4. Comparação dos íntrons de fungos causadores de ferrugens

Características dos íntrons, como o número, tamanho, posição e conservação dos nucleotídeos foram avaliadas, considerando-se três espécies pertencentes à ordem *Uredinales*. Uma é o *P. pachyrhizi*, enquanto as outras duas (*Melampsora line* e *Uromyces viciae-fabae*) foram obtidas do GenBank, sendo estas as duas únicas espécies causadoras de ferrugens cujo gene da β-tubulina está, completamente, sequenciado até o momento.

Segundo Ayliffe et al. (2001), o número de íntrons dentro do gene da β-tubulina de basidiomicetos pode variar entre 6 e 10, dependendo da espécie considerada. No entanto, as três espécies de fungos utilizadas nesta comparação apresentaram oito íntrons (Tabela 2), refletindo, assim, as relações evolutivas entre elas. Estes achados são condizentes com os resultados encontrados por Pereira et al. (2004), os quais mostraram que a alocação de fungos filamentosos pode ser correlacionada com a posição e número dos íntrons.

Em geral, não foram verificadas semelhanças quanto ao tamanho (em pares de base) dos íntrons pertencentes à mesma posição no gene. Na análise, o maior íntron apresentou 128 pb enquanto o menor, 62 pb (em negrito na Tabela 2).

Tabela 2. Número e tamanho (em pares de base) dos íntrons das únicas três espécies de fungos causadores de ferrugens com o gene da β-tubulina completamente sequenciado

Íntron	*P. pachyrhizi*	*U. viciae-fabae*	*M. line*
1	125	72	78
2	76	104	74
3	86	86	117
4	102	75	98
5	85	79	106
6	84	71	86
7	99	92	**62**
8	**128**	78	72

A análise dos oito íntrons, pertencentes aos genes da β-tubulina nestas espécies, mostrou que a localização dos íntrons é altamente conservada, ocorrendo nas posições 5, 11, 17, 35, 51, 345, 402 e 443 para *U. viciae-fabae* e *M. line*; com

pequenas alterações em *P. pachyrhizi*, que apresentou íntrons nas posições 5, 11, 17, 35, 50, 344, 401 e 441 (Figura 10).

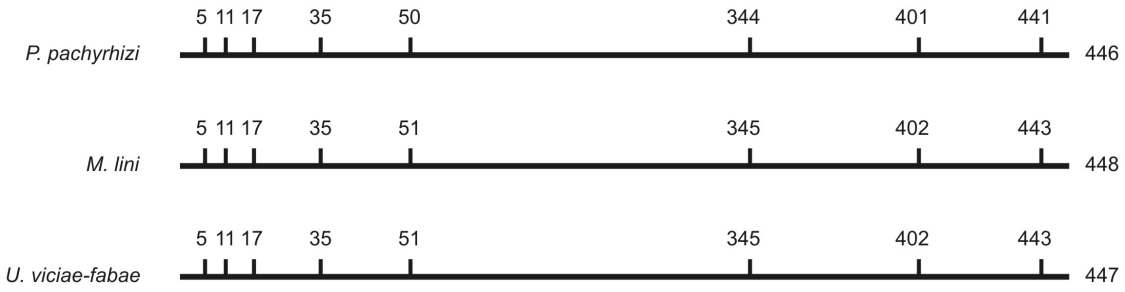

Figura 10. Posição dos íntrons no gene da β-tubulina de fungos causadores de ferrugens. A linha horizontal representa a região codificadora do gene da β-tubulina com a localização dos íntrons marcada por uma linha vertical. O número em cima de cada linha vertical refere-se ao códon que está: ou imediatamente a 5' do íntron ou interrompido pelo íntron. O número de códons dentro da região codificadora (excluindo o códon de terminação da tradução) é dado no final de cada linha (equivalente ao número de aminoácidos da proteína). O nome das espécies utilizadas nesta comparação se encontra ao lado esquerdo da figura.

Comparações entre as sequências dos íntrons, localizados na mesma posição no gene, mostraram pouca identidade (aproximadamente 30%), sendo considerados na análise apenas os nucleotídeos, que alinharam em todos os oito íntrons analisados.

6. CONCLUSÕES

✓ O gene da β-tubulina de *P. pachyrhizi* sequenciado possui 2815 pb, sendo sua ORF constituída de 1341 pb. Do restante, 452 pb correspondem à região promotora e 234 pb pertencem à extremidade 3' não traduzida, sendo este gene constituído de nove éxons e oito íntrons. Foram localizados, ainda, os códons de início (ATG) e final da tradução (TAG). Conforme esperado, a região promotora apresentou os sinais típicos TATA box e CAAT box, envolvidos com o início da transcrição, assim como a sequência consenso AATAAA envolvida no processo de poliadenilação do mRNA precursor. Sítios envolvidos no mecanismo de *splicing* foram encontrados, flanqueando todos os íntrons.

✓ A fase aberta de leitura (ORF) encontrada para este gene codifica uma proteína de 446 aminoácidos, a qual apresenta elevada similaridade (acima de 89%) com β-tubulina de outras espécies de fungos relacionados e, até mesmo, com organismos mais distantes evolutivamente, comprovando, assim, que a sequência de aminoácidos desta proteína foi conservada com o passar do tempo. Ao comparar a sequência de aminoácidos predita para β-tubulina, identificou-se que esta proteína possui quatro domínios conservados, sendo eles: domínio de ligação a nucleotídeos, domínio de ligação ao taxol, domínio de interface alfa/beta e domínio de interface beta/alfa.

✓ Análises filogenéticas, realizadas com base nas sequências de nucleotídeos do gene da β-tubulina, proporcionaram a alocação das espécies causadoras de ferrugens analisadas em um clado único. Conforme esperado, essas análises alocaram *P. pachyrhizi* junto aos demais fungos causadores de ferrugens. Estes resultados, aliados àqueles do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína β-tubulina, reforçam o argumento de que não houve contaminação do DNA de *P. pachyrhizi* com DNA de soja, durante a extração do material genético de *P. pachyrhizi*.

✓ Análises dos íntrons de *P. pachyrhizi* com os íntrons das duas únicas espécies causadoras de ferrugens, que apresentam o gene da β-tubulina completamente sequenciado até o momento, mostraram um elevado grau de

conservação no número e posição dos íntrons, sendo esta uma característica comum da ordem *Uredinales*. Em geral, não foram verificadas semelhanças quanto ao tamanho dos íntrons pertencentes à mesma posição no gene. Comparações entre as sequências dos íntrons localizados na mesma posição no gene mostraram pouca identidade (aproximadamente 30%).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology.** 5 ed. Academic Press, 2004. 922p.

AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética.** Holos Editora, Ribeirão Preto, 2002. 136.

AKINSANMI O. A.; LADIPO J. L. First report of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Nigeria, **Plant Disease,** v.85, p. 97, 2001.

ANDRADE, P. J. M.; ARARIPE-ANDRADE, D. F. A. **Ferrugem asiática: uma ameaça a sojicultura brasileira.** Brasília, DF: Embrapa Agropecuária Oeste, 2002. 11 p. (Circular técnica, 11).

AYLIFFE, M. A.; DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J. Characterisation of a β-tubulin gene from *Melampsora lini* and comparison of fungal β-tubulin genes. **Mycological Research,** v.105, p.818-826, 2001.

BALLANCE, D. J. Sequence important for gene expression in filamentous fungi. **Yeast,** v.2 p.229-236, 1986.

BEOM-GI, K.; YOUNG-BOK, Y.; SUK-TAE, K.; YUMI, M. Molecular Characterization of β-tubulin gene from *Pleurotus sajor-caju*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** v.65, p.2280-2283, 2001.

CHIANG, Y. C.; GE, X. J.; CHOU, C. H.; WU, W. L.; CHIANG, T. Y. Nucleotide sequence diversity at the methionine synthase locus in endangered *Dunnia sinensis* (*Rubiaceae*): An evaluation of the positive selection hypothesis. **Molecular Biology and Evolution,** v.19, p.1367-1375, 2002.

CNA - Confederação da Agricultura e pecuária do Brasil. **Agropecuária Brasileira**. Disponível em: <www.cna.org.br>. 2007

COOLEY, R. N.; CATEN, C. E. Molecular analysis of the *Septoria nodorum* β-tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. **Molecular and General Genetics,** v.237, p.58-64, 1993.

COSTA, J. A. **Cultura da soja.** Porto Alegre: ed. Evangraf, 1996. 233 p.

COSTA, M. M.; MAURO, A. O. D.; TREVISOLI, S. H. U.; ARRIEL, N. H. C.; BÁRBARO, I. M.; MUNIZ, F. R. S. Ganho genético por diferentes critérios de seleção em populações segregantes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v.39, p.1095-1102, 2004.

DALL´AGNOL, A. Current status of soybean production and utilization in Brazil. In: World Soybean Research Conference, 7., Foz do Iguaçu - PR, February 29 to March 5, 2004. **Proceedings...** Londrina: EMBRAPA, p. 10-18.

DIBB, N. J.; NEWMAN, A. J. Evidence that íntrons arose at proto-splice sites. **The EMBO Journal,** v.8, p.2015-21, 1989.

DOWNING, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. **Cell & Developmental Biology,** v.16, p.89-111, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus,** v.12, p.13-15, 1887.

EDGCOMB, V. P.; ROGER, A. J.; SIMPSON, A. G. B.; KYSELA, D.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships among ‘‘jakobid’’ flagellates as indicated by alpha- and β-tubulin phylogenies. **Molecular Biology and Evolution,** v.18, p.514-522, 2001.

EDLIND, T. D.; Li, J.; VISVESVARA, G. S.; VODKIN, M. H.; MCLAUGHLIN, G. L.; KATIYAR, S. K. Phylogenetic analysis of β-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. **Molecular and Phylogenetic Evolution,** v.5, p.359-367, 1996.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2006 – Sistemas de produção, 9. Londrina: Embrapa soja; Embrapa Cerrados; Embrapa agropecuária Oeste, 2005. 220p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Programa nacional de pesquisa de soja**. Brasília, 1981. 115 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em<www.fao.org> Acesso em Março 2008.

FENG, P. C. C.; BALEY, G. J.; CLINTON, W. P.; BUNKERS, G. J.; ALIBHAI, M. F.; PAULITZ, T. C.; KIDWELL, K. K. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.102, p.17290-17295, 2005.

Freire Maíra C. M., Oliveira Luiz O. de, Almeida Álvaro M. R. de, Schuster Ivan, Moreira Maurilio A., Liebenberg Merion M. et al . Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. **Genetics and molecular biology**, v.31, p.920-931, 2008.

GEISER, D. M.; FRISVAD, J. C.; TAYLOR, J. W. Evolutionary relationships in *Aspergillus* section Fumigati inferred from partial β-tubulin and hydrophobin DNA sequences. **Mycologia,** v.90, p.831-845, 1998.

GUPTA, G. K.; ANSARI, M.; KARMAKAR, P.; HUSAIN, S.; RAMTEKE, R. Resurrection of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in India. In: **Kauffman HE (ed) World soybean research conference VI. University of Illinois**, Chicago, IL, p.617, 1999.

GURR, S. J.; UNKLES S. E.; KINGDOM J. R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi, *In* J. R. Kingdom (ed.), **Gene structure in eukaryotic microbes,** v. 22, p. 93-139, 1987.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. Saint Paul: APS, 1999, 128 p.

HYAMS, J. S.; LLOYD, C. W. (eds.). **Microtubules,** New York: Wiley-Liss, 1994.

JACKSON, A. P.; VAUGHAN, S.; GULL, K. Comparative genomics and concerted evolution of β-tubulin paralogs in *Leishmania spp*. **BMC Genomics,** v.7, p.137, 2006.

KAWCHUK, L. M.; HUTCHISON, L. J.; VERHAEGHE, C. A., LYNCH, D. R.; BAINS, P. S.; HOLLEY, J. D. Isolation of the β-tubulin gene and characterization of thiabendazole resistence in *Gibberella pulicaris*. **Plant Pathology,** v.24, p.233-238, 2002.

KAWUKI, R. S.; ADIPALA, E.; TUKUMUHABWA, P. Yield loss associated with soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. **Journal of Phytopathology,** v.151, p.7-12, 2003.

LEVY, C. Zimbawe – a country report on soybean rust control. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., 2004. Foz do Iguaçu. **Proceedings…** Londrina: Embrapa Soja, 2004. p. 340-348.

LEVY, C. Epidemiology and chemical control of soybean rust in southern Africa. **Plant Disease,** v.89, p.669-674, 2005.

LIAUD, M. F.; BRINKMANN, H.; CERFF, R. The β-tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron-dependent evolution of genes. **Plant Molecular Biology,** v.18, p.639-51, 1992.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; GUARRO, J. Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii.* **Journal of Clinical Microbiology,** v.44, p.3251-3256, 2006.

MENDGEN, K.; WIRSEL, S. G. R.; JUX, A.; HOVMANN, J.; BOLAND, W. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta,** v.224, p.1353-1361, 2006.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. de M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holo, 2001. 97-107 p.

NEI, M., SAITOU, N. The *Neighbor-Joining* method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution,** v.4, p.406-425. 1987.

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

PANTHEE, D. R.; YUAN, J. S.; WRIGHT, D. L.; MAROIS, J. J.; MAILHOT, D.; STEWART Jr, C. N. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional & integrative genomics,** v.7, p.291-301, 2007.

POSTINGL, H.; KRAUHS, E.; LITTLE, M.; KEMPF, T. Complete amino acid sequence of α-tubulin from porcine brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.78, p.2757-2761, 1981.

RAMTEKE, R.; KARMAKAR, P. G.; GUPTA, G. K.; SINGH, R. K.; KHAN, I. R. Resistance genes for rust and yellow mosaic diseases in soybean. **Journal Oilseeds Research,** v.20, p.195-203, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The *neighbor-joining* method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution,** v.24, p.184-204, 1987.

SCHNEIDER, R. W.; HOLLIER, C. A.; WHITAM, H. K.; PALM, M. E.; MCKEMY, J. M.; HERNÁNDEZ, J. R.; LEVY, L.; DEVRIES-PATERSON, R. First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. **Plant Disease,** v.89, p.774, 2005.

SCHNEIDER, K. T.; MORTEL, M. V. D.; NETTLETON, D.; FREDERICK, R. D.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. Microarray analysis of Rpp3-mediated resistance to soybean rust infection. In: **Proceedings of the National Soybean Rust Symposium,** St. Louis, 29 November–1 December 2006.

SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética: Um guia prático.** 3. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira De Genética e Holos, 2007, 200p.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L. L. **Cultura da Soja.** Ed. UFV, Viçosa, 1996.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Management of Soybean Rust. In: SOYBEAN RUST WORKSHOP. 1995. URBANA. **Proceedings…** URBANA : College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, 1999. p.6-10.

SOARES, R. M.; RUBIN, S. D. A. L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural,** v.34, n.34, p.1245-1247, 2004.

STEFAN, G. R. W.; RALF, T. V.; RETO, B.; KURT, W. M. Cloning of *b*-tubulin and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation. **Plant Pathology,** v.110, p. 767-777, 2004.

STOKSTAD, E. Plant pathologists gear up for battle with dread fungus. **Science,** v.306, p.1672-1673, 2005.

STOTZ, H. U.; LONG, S. R. Expression of the pea (*Pisum sativum* L.) alpha-tubulin gene is correlated with cell division activity. **Plant Molecular Biology,** v.41, p.1-14, 1999.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution,** v.24, p.1596-1599, 2007. (Publication PDF at http://www.kumarlab.net/publications).

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensibility of progressive sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalities and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research,** v.22, p.4673-4680, 1994. (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html).

THON, M. R.; ROYSE, D. J. Partial β-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. **Mycologia,** v.91, p.468-474, 1999.

TUSZYNSKI, J. A.; CARPENTER, E. J.; HUZIL, J. T.; MALINSKI, W.; LUCHKO, T.; LUDUEÑA, R. F. The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. **Developmental Biology,** v.50, p.341-358, 2006.

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

VAN DER MERWE, M.; ERICSON, L.; WALKER, J. Evolutionary relationships among species of Puccinia and Uromyces (Pucciniaceae, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. **Mycological Research,** p.163-175, 2007.

WOLFGANG J.; ARMIN B.; PETER N.; RALF R.; GILBERT G. A large plant β-tubulin family with minimal C-terminal variation but differences in expression. **Gene,** v.340, p.151-160, 2004.

WU, W. L.; SCHAAL, B. A.; HWANG, C. Y.; HWANG, M. D.; CHIANG, Y. C.; CHIANG, T. Y. Characterization and adaptive evolution of α-tubulin genes in the *Miscanthus sinensis* complex (poaceae). **Botany,** v.90, n.10, p.1513-1521, 2003.

YAGUCHI, T.; HORIE, Y.; TANAKA, R.; MATSUZAWA, T.; ITO, J.; NISHIMURA, K. Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section fumigati isolated from clinical specimens in Japan. **Mycology**, v.48, p.37-46, 2007.

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

YORINORI, J. T. Ferrugem Asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): ocorrência no Brasil e estratégias de manejo. In: Encontro Brasileiro sobre Doenças da Cultura da Soja, 2, 2002, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2002, p.47-54.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. 2002. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow.** Londrina: Embrapa soja. 7p. 1 Folder.

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

ZHOU, J.; KLEINHOFS, A. Molecular evolution of nitrate reductase genes. **Jounal of Molecular Evolution,** v.42, p.432-442, 1996.

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