

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Sementes



TESE

Expressão de genes em plantas de soja sob infecção pela ferrugem asiática e efeito do controle químico na qualidade de sementes

Fernando Augusto Henning

Pelotas, julho de 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO AUGUSTO HENNING

Expressão de genes em plantas de soja sob infecção pela ferrugem asiática e efeito do controle químico na qualidade de sementes

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Professor Paulo Dejalma Zimmer, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

Pelotas, julho de 2010.

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

H517e Henning, Fernando Augusto

Expressão de genes em plantas de soja sob infecção pela ferrugem asiática e efeito do controle químico de sementes / Fernando Augusto Henning ; orientador Paulo Dejalma Zimmer - Pelotas,2010.-75f. ; il..- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Glycine Max 2.Phakopsora pachyrhizi 3.Genes de resistência 4.Tratamento químico 5. Qualidade de sementes I.Zimmer, Paulo Dejalma(orientador) II

Banca Examinadora

Antônio Costa de Oliveira
FAEM/UFPel

Francisco Amaral Villela
FAEM/UFPel

Luis Osmar Braga Schuch
FAEM/UFPel

Francisco de Jesus Verneti Júnior
Embrapa CPACT

Paulo Dejalma Zimmer
Orientador

Dedico

*A minha noiva Liliane pelo amor,
dedicação, carinho e incentivo
constante durante todos esses anos
de convivência.*

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

À minha família que apesar da distância física sempre esteve presente.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da UFPel, em especial ao orientador desse trabalho Professor Paulo Dejalma Zimmer, pela orientação e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa soja Ademir Assis Henning e Ricardo Abdelnoor, pela concessão dos materiais, espaço físico e agradáveis discussões.

Ao Centro de Biotecnologia da Embrapa soja pelo sequenciamento dos materiais.

Aos professores e amigos do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPel, Antônio Costa de Oliveira e Luciano Carlos da Maia (Paulista), pela agradável convivência e pelas valiosas discussões no decorrer do trabalho.

Ao Centro de Biotecnologia da UFPel, em especial ao professor Odir Dellagostin, pelo auxílio durante a execução do trabalho e pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Sementes pela amizade e convivência.

Ao CAPES, CNPq e FAPERGS, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram para execução desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Cultura da soja.....	5
2.1.1. Caracterização genética	5
2.1.2. Soja no Brasil X uso de sementes de qualidade X doenças.....	6
2.2. Ferrugem asiática da soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>).....	7
2.2.1. Agente Causador.....	7
2.2.2. Sintomatologia.....	9
2.2.3. Hospedeiros alternativos.....	10
2.2.4. Danos e perdas causados pelo patógeno.....	10
2.2.5. Manejo da doença.....	11
2.2.6. Interação patógeno-hospedeiro.....	12
2.3. cDNA-AFLP.....	13

3.	CAPITULO I: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM RESPOSTA À FERRUGEM DA SOJA PELA TÉCNICA DE cDNA-AFLP.....	15
3.1.	RESUMO.....	16
3.2.	SUMMARY.....	17
3.3.	INTRODUÇÃO.....	18
3.4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.4.1.	Produção do material vegetal.....	21
3.4.2.	Preparo do inóculo e inoculação das plantas.....	22
3.4.3.	Extração do RNA total.....	24
3.4.4.	Obtenção do cDNA dupla fita.....	25
3.4.4.1.	Síntese da primeira fita do cDNA.....	25
3.4.4.2.	Síntese da segunda fita do cDNA.....	26
3.4.5.	cDNA-AFLP.....	27
3.4.5.1.	Reação de digestão do cDNA.....	27
3.4.5.2.	Ligação de adaptadores.....	28
3.4.5.3.	Pré-amplificação.....	28
3.4.5.4.	Amplificação seletiva.....	29
3.4.6.	Detecção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos.....	31
3.4.6.1.	Preparo e montagem das placas.....	31
3.4.6.2.	Preparo da solução do gel de poliacrilamida (5%).....	31
3.4.6.3.	Revelação do gel com nitrato de prata (BLEIDER, 1982; CRESTE, 2001)	32
3.4.7.	Resgate e purificação das bandas selecionadas.....	34
3.4.8.	Clonagem dos fragmentos de cDNA reamplificados.....	34
3.4.8.1.	Reação de ligação.....	34
3.4.8.2.	Transformação por eletroporação.....	35

3.4.8.3. Seleção das colônias transformadas e extração do DNA plasmidial.....	35
3.4.9. Sequenciamento dos fragmentos de cDNA e análise <i>in sílico</i>	36
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.6. CONCLUSÃO.....	51
4. CAPÍTULO II EFEITO DE FUNGICIDAS UTILIZADOS NO CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NA QUALIDADE DE SEMENTES	52
4.1. RESUMO.....	53
4.2. SUMMARY.....	54
4.3. INTRODUÇÃO.....	55
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.4.1. Produção do material vegetal.....	58
4.4.2. Avaliação da qualidade das sementes.....	60
4.4.2.1. Teste de germinação.....	60
4.4.2.2. Envelhecimento acelerado.....	60
4.4.2.3. Método do papel-de-filtro.....	61
4.4.3. Análise estatística.....	61
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.6. CONCLUSÕES.....	66
5. CONCLUSÃO GERAL.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esporos (uredósporos) do fungo (*Phakopsora pachyrhizi*), coletados a partir de folhas de soja infectadas pelo patógeno. Londrina-PR, 2008..... 23
- Figura 2.** A) Inoculação de esporos do fungo (*Phakopsora pachyrhizi*) em plantas de soja do genótipo (PI459025). B) Tratamento sem inoculação. Londrina-PR, 2008..... 23
- Figura 3.** RNA total extraído de folhas de soja provenientes de plantas com e sem infecção pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, em diferentes períodos (horas), utilizando o reagente Trizol (Invitrogen)..... 39
- Figura 4.** cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, no genótipo (PI459025) com e sem infecção pelo fungo causador da ferrugem da soja. M - Marcador de peso molecular 1Kb. Setas indicam genes diferencialmente expressos..... 40
- Figura 5.** Bandas oriundas da técnica de cDNA-AFLP, resgatadas do gel de poliacrilamida e reamplificadas. M – marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio..... 42

Figura 6. DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes utilizando o FlexiPrep™ Kit (GE Healthcare) e visualizado em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio. C – controle.....	42
Figura 7. DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes, digerido com enzimas de restrição <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III e visualizado em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinações de iniciadores testados nas reações de amplificação seletiva no genótipo (PI459025) infectado e não infectado pelo fungo, aonde <i>M</i> é iniciador complementar ao sítio de restrição da enzima <i>Mse</i> I e <i>E</i> é iniciador complementar ao sítio de restrição da enzima <i>Eco</i> R I.....	29
Tabela 2. Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.....	30
Tabela 3. Número de fragmentos polimórficos obtidos de acordo com diferentes combinações de iniciadores do kit de AFLP, entre genótipo infectado e não infectado com ferrugem.....	40
Tabela 4. Sequências que apresentaram similaridade com fragmentos de cDNA-AFLP diferencialmente expressos em resposta a ferrugem da soja, no genótipo de soja (PI459025).....	43
Tabela 5. Fungicidas químicos utilizados no controle da ferrugem da soja, cultivar BRS 245 RR. Londrina-PR, 2009.....	58
Tabela 6. Qualidade fisiológica de sementes de soja sementes de soja oriundas de plantas tratadas com diferentes fungicidas químicos	

aplicados para o controle da ferrugem da soja.....	62
Tabela 7. Qualidade sanitária de sementes de soja oriundas de plantas tratadas com diferentes fungicidas químicos aplicados para o controle da ferrugem da soja.....	64

EXPRESSÃO DE GENES EM PLANTAS DE SOJA SOB INFECÇÃO PELA FERRUGEM ASIÁTICA E EFEITO DO CONTROLE QUÍMICO NA QUALIDADE DE SEMENTES

Autor: Fernando Augusto Henning

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

RESUMO - A cultura da soja é afetada por inúmeras doenças, destacando-se dentre essas a ferrugem asiática da soja causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Os prejuízos em decorrência da ação desse patógeno levam a perdas de produtividade, como também, redução na qualidade das sementes produzidas. Todavia, aplicações de fungicidas necessárias para o controle da doença, além de incrementar os custos de produção, podem provocar um efeito residual desses produtos na planta, podendo afetar a qualidade fisiológica das sementes. Diante do exposto conduziu-se esse estudo, o qual foi dividido em dois capítulos. O primeiro trabalho “Expressão gênica diferencial em resposta à ferrugem asiática da soja pela técnica de cDNA-AFLP” teve por objetivo identificar genes relacionados à resistência à ferrugem da soja através da técnica de cDNA-AFLP na cultivar (PI459025) a qual possui genes de resistência *Rpp4*. O segundo capítulo intitulado “Efeito de fungicidas utilizados no controle da ferrugem asiática da soja na qualidade de sementes” tendo por objetivo avaliar o efeito de aplicações de fungicidas utilizados no controle da ferrugem da soja na qualidade sanitária e fisiológica de sementes. Pela técnica de cDNA-AFLP foi possível isolar 141 fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos entre plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno causador da ferrugem permitindo identificar genes relacionados com a resistência a patógenos os quais podem ser apontados como fortes candidatos para resistência a doença. Com relação aos fungicidas para o controle da ferrugem da soja, esses não prejudicaram a qualidade fisiológica das sementes.

Palavras chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, genes de resistência, qualidade de sementes, tratamento químico.

**GENE EXPRESSION OF SOYBEAN PLANTS UNDER INFECTION BY ASIAN
SOYBEAN RUST AND THE EFFECT OF CHEMICAL CONTROL ON SEED
QUALITY**

Author: Fernando Augusto Henning

Adviser: Paulo Dejalma Zimmer

SUMMARY - Soybean crop is affected by several diseases, especially asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. The action of this pathogen leads to yield losses, as well as, reduction in seed quality. Furthermore, fungicide applications needed to control the disease, increase production costs and can cause a residual effect on plants, which can affect the seed physiological quality. This study was divided into two chapters. The first is "Differential gene expression in response to asian soybean rust by cDNA-AFLP technique" that aimed at identifying genes associated with soybean rust resistance in the cultivar (PI459025), which has *Rpp4* resistance genes. The second chapter is "Fungicides used to control asian soybean rust and the effect on seed quality" that aimed at evaluating the effect of fungicides used to control soybean rust in the seed physiological and sanitary qualities. One hundred and forty one cDNA fragments differentially expressed between inoculated and not inoculated soybean plants were isolated by cDNA-AFLP. This strategy allowed the identification of pathogen resistance genes which can be strong candidates to asian soybean rust resistance. In relation to fungicides used to control asian soybean rust, they did not affect seed physiological quality.

Keywords: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, resistance genes, seed quality, chemical control.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, durante a safra 2008/09, foram cultivados aproximadamente 22 milhões de hectares de soja, com uma produção que ultrapassou 57 milhões de toneladas, demonstrando a importância econômica deste produto para o país (CONAB, 2010).

A soja tornou-se a principal cultura agrícola, representando mais de 10% das exportações brasileiras. O potencial genético de produção de grãos da cultura é de aproximadamente 18 t.ha^{-1} , porém, fatores como fertilidade do solo, manejo, estresse hídrico, oscilações climáticas, plantas daninhas, pragas e doenças reduzem a produtividade a valores abaixo de 4 t.ha^{-1} (VENTIMIGLIA et al., 1999),.

A cultura da soja é afetada por um grande número de doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Nos últimos anos, uma doença que tem merecido destaque na cultura da soja é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow e Sydow (YORINORI, 1986).

A ferrugem asiática foi identificada pela primeira vez no Brasil, como causadora de danos econômicos, na safra de 2000/01 (YORINORI, 2002). No Brasil, as estimativas de perdas de grãos realizadas, desde seu aparecimento até a safra 2008/09, atingiram mais de 15 milhões de toneladas com um custo de

aproximadamente U\$12 bilhões (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2010). Na safra 2002/03, a doença atingiu mais intensamente o estado da Bahia, causando um prejuízo em torno de R\$300 milhões, afetando 30% da produção do estado, que caiu para 1,4 milhões de toneladas. Perdas de até 90 % ocorreram em alguns locais onde a doença ocorreu com alta severidade (YORINORI, 2004).

A magnitude das perdas na produtividade tem sido correlacionada com o início da doença em relação ao estágio de crescimento do hospedeiro. Além da redução na produtividade, observaram-se ainda prejuízos na qualidade das sementes produzidas, o que poderia ser reduzido, caso houvesse cultivares efetivamente resistentes ao ataque do patógeno (OGLE et al., 1979).

Desde o aparecimento da doença no Brasil, na safra 2001/02, cultivares que haviam sido selecionados com resistência completa tiveram sua resistência quebrada com isolados do fungo provenientes do Mato Grosso (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2005).

Na literatura, as principais fontes citadas para resistência à ferrugem são as *PIs* (*Plant Introductions*), as quais fazem parte do germoplasma exótico. Entretanto, a utilização desses genótipos em programas de melhoramento tem sido dificultada devido ao baixo potencial agrônômico que essas apresentam e por não serem adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras (MEDEIROS, 2009).

A obtenção de cultivares resistentes que apresentem elevada produtividade tem sido o foco de muitos estudos. Nesse sentido, o conhecimento do germoplasma disponível e a identificação de genes de resistência possibilitariam a introdução desse caráter em cultivares modernas com elevado potencial produtivo (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2008).

Cinco genes de resistência à ferrugem asiática dominantes e independentes foram descritos na literatura: *Rpp1* (PI200492, Komata), *Rpp2* (PI230970), *Rpp3* (PI462312, Ankur), *Rpp4* (PI459025, Bing nan) (BROMFIELD e HARTWIG, 1980; McLEAN e BYTH, 1980; HARTWIG e BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986) e *Rpp5* (GARCIA et al., 2008). Atualmente, dentre esses genes, somente o *Rpp2* e o *Rpp4* permanecem resistentes, pois em 2003 uma nova raça de *P. pachyrhizi* quebrou a resistência conferida pelos genes *Rpp1* e *Rpp3* (ARIAS et al., 2004).

Um impedimento principal para o desenvolvimento de linhagens com reduzida taxa de desenvolvimento da doença têm sido a dificuldade de se avaliar genótipos de populações segregantes ou de acessos com diferentes períodos de maturação. Além das diferenças fisiológicas, há variações nas condições ambientais, pois as plantas amadurecem em diferentes períodos de tempo (BROGIN, 2005). Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares associados ao caráter de interesse possibilitaria a utilização da SAMM (seleção assistida por marcadores moleculares) visando o desenvolvimento de cultivares resistentes. Além disso, a identificação de genes relacionados à resistência a doença possibilitaria a introdução desse caráter em cultivares modernas e de elevado valor agrônomo por meio da utilização de ferramentas biotecnológicas.

Diante do exposto, desenvolveu-se essa tese intitulada: “Expressão de genes em plantas de soja sob infecção pela ferrugem asiática e efeito do controle químico na qualidade de sementes”. O primeiro capítulo “Expressão gênica diferencial em resposta à ferrugem asiática da soja pela técnica de cDNA-AFLP” teve como objetivo identificar genes relacionados à resistência à ferrugem da soja através da técnica de cDNA-AFLP no genótipo (PI459025). O segundo capítulo,

que está em formato de artigo científico, “Efeito de fungicidas utilizados no controle da ferrugem asiática da soja na qualidade de sementes” teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de fungicidas utilizados no controle da ferrugem da soja na qualidade sanitária e fisiológica de sementes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura da soja

2.1.1. Caracterização genética

A soja pertence à família Fabaceae, à subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae e ao gênero *Glycine*. Evidências históricas e geográficas indicam que a soja surgiu como uma espécie domesticada na metade leste do norte da China, em torno do século XI a.C. Essa região engloba toda a província de Shantung e uma grande área das províncias vizinhas (Honan, Hopei, Kiangsu e Anhwei). As províncias Heilongjiang, Jilin e Liaoning (Manchúria), localizadas na porção mais ao norte da China, formam um segundo centro genético (centro de diversificação). Atualmente, a produção de soja na China está concentrada na região nordeste. Apenas a província Heilongjiang é responsável por 30% da produção total da soja na China. A soja silvestre *G. soja* é encontrada em ambas as regiões, enquanto que *G. max* forma *gracilis* é mais frequentemente observada na Manchúria, e sua maior presença nessa porção da China é explicada pelo cultivo intenso de soja nessa região, o que aumenta a probabilidade da ocorrência de cruzamentos entre

a espécie cultivada e a silvestre. Outro centro de diversificação da soja é formado pelo Japão, Tailândia, Vietnã, Malásia, Burna, Nepal e Norte da Índia, onde a soja foi introduzida durante os primeiros séculos depois de Cristo, e se estabeleceu como uma cultura de grande relevância para a alimentação desses povos (LANGE, 2008).

2.1.2. Soja no Brasil X uso de sementes de qualidade X doenças

A partir da década de 1970, a cultura da soja evoluiu significativamente no Sul e Sudeste do Brasil, e em meados de 1980 na região Centro-Oeste. Com o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às diferentes regiões do País, o Brasil tornou-se o segundo maior produtor mundial de soja (BONATO e BONATO, 1987).

A soja é uma das principais fontes de proteína e óleo vegetal do mundo. Ela tem sido cultivada comercialmente e utilizada nas alimentações humana e animal por milênios. É amplamente cultivada em vários países do mundo, sendo os principais produtores os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina e a China. No Brasil, as principais áreas produtoras estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do País. Os Estados do Mato Grosso seguido por Paraná e pelo Rio Grande do Sul são os principais estados produtores de soja do Brasil (CONAB, 2010).

O acentuado crescimento da produção de soja no Brasil, de quase 30 vezes no transcorrer de apenas três décadas, determinou uma cadeia de mudanças, sendo responsável pela aceleração da mecanização das lavouras brasileiras; pela modernização do sistema de transportes; pela expansão da

fronteira agrícola; pela profissionalização e incremento do comércio internacional; pela modificação e enriquecimento da dieta alimentar dos brasileiros; pela aceleração da urbanização do País; pela interiorização da população brasileira (excessivamente concentrada no sul, sudeste e litoral); pela tecnificação de outras culturas (destacadamente a do milho); assim como, impulsionou e interiorizou a agroindústria nacional (EMBRAPA SOJA, 2003).

Devido a toda esta transformação propiciada pela soja, e de sua grande importância para a economia brasileira, cada vez mais deve-se zelar por safras mais produtivas. O início de uma boa safra começa com a utilização de sementes de qualidade, pois através destas que as tecnologias introduzidas pelo melhoramento genético são levadas até o agricultor.

Dentre as doenças que reduzem a quantidade de sementes, ou até mesmo da qualidade destas, destaca-se a ferrugem da soja. Sob condições controladas, a ferrugem provocou redução no número de vagens cheias, de sementes por vagem e no peso médio de sementes (MELCHING et al., 1989). Trabalho conduzido por Andrade e Andrade (2006) em plantas atacadas pelo fungo e posteriormente submetidas ao tratamento químico com fungicidas, mostraram redução de aproximadamente 20% na produção de sementes.

2.2. Ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)

2.2.1. Agente causador

A ferrugem da soja é considerada uma das doenças mais destrutivas e a que causa maiores danos em várias espécies de plantas da família *Fabaceae*. A

ferrugem da soja difere das outras ferrugens, pois produz lesões nas folhas dos hospedeiros e, em cada lesão, são formadas inúmeras pústulas. A massa de esporos presentes nas pústulas, não apresenta coloração ferruginosa, pois, os uredósporos são hialinos, além disso, o esporo não penetra pelo estômato, mas diretamente pelo tecido epidérmico (REIS e BRESOLIN, 2004).

Existem duas espécies de ferrugem do gênero *Phakopsora*: *Phakopsora meibomiae*, agente causal da “ferrugem americana” e *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da “ferrugem asiática”. A distinção das duas espécies de ferrugem pode ser feita através da morfologia de teliosporos e da análise do DNA. *Phakopsora pachyrhizi* é a espécie responsável pelas recentes epidemias da doença no Brasil, tendo sido relatada pela primeira vez no Japão, em 1903. Desde então se disseminou rapidamente pelo continente Asiático, permanecendo endêmica, porém com surtos epidêmicos esporádicos (ONO et al., 1992).

Na década de 1990 foi relatada pela primeira vez no continente Africano, em 2001 na América do Sul, no Paraguai e Brasil e em 2004 nos Estados Unidos. Quando constatada nas lavouras brasileiras a doença foi motivo de grande preocupação devido a sua importância e alto potencial de danos nos países asiáticos (YORINORI e PAIVA, 2002).

A ferrugem "americana" foi identificada no Brasil, em Lavras (MG), em 1979. Sua ocorrência é mais comum no final da safra, em soja "safrinha" (outono/inverno) e em soja voluntária, estando restrita às áreas de clima mais ameno. O fungo *P. meibomiae* raramente causa danos econômicos. Além da soja, o fungo infecta diversas leguminosas, sendo mais frequentemente observada na soja perene, *Neonotonia wightii* (sinon. *Glycine javanica*). (EMBRAPA SOJA, 2003).

2.2.2. Sintomatologia

Os principais sintomas da ferrugem da soja são observados nas folhas. Normalmente, a doença se inicia pelas folhas localizadas nas partes baixas da planta. Os primeiros sintomas são caracterizados por minúsculos pontos escuros (no máximo 1mm de diâmetro), no tecido sadio da folha, com coloração esverdeada à cinza-esverdeada, observados mais facilmente contra um fundo claro. Na face inferior das folhas podem ser observadas saliências que correspondem a estruturas de frutificação do fungo (urédias). São essas saliências que diferenciam a ferrugem das outras doenças sendo sua observação facilitada com auxílio de uma lupa com capacidade de aumento de 10 a 20 vezes (YORINORI et al., 2004).

A presença de água na superfície da folha é um fator essencial para o início do processo de infecção pelo fungo. São necessários pelo menos seis horas de molhamento foliar, sendo ideal para o fungo, molhamento acima de 10 horas. Esse "molhamento foliar" pode ser ocasionado tanto pelo orvalho como pela chuva. Regiões mais altas, com temperaturas noturnas mais amenas (20°C), apresentam um maior número de horas de orvalho, favorecendo o processo de infecção. A ocorrência de chuvas bem distribuídas também favorece a infecção. (YORINORI et al., 2004).

A ferrugem asiática da soja ocorre em folhas como lesões palha (TAN) a marrom escuro ou marrom avermelhado (RB) com uma ou muitas urédias erumpentes, globosas e estioladas. As lesões TAN caracterizam genótipos suscetíveis à ferrugem, enquanto que as lesões RB (*Reddish-Brown*), caracterizam a reação de resistência dos genótipos (HARTMAN et al., 1997).

2.2.3. Hospedeiros alternativos

Atualmente o fungo *Phakopsora pachyrhizi* ocorre em aproximadamente 150 espécies em 53 gêneros de leguminosas da família *Fabaceae*, assim como em alguns hospedeiros como a anileira (*Crotalaria alanceolata*), mucuna preta (*Mucuna cochinchinesis*), feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), caupi (*Vigna unguiculata*), carrapicho (*Desmodium* sp.), quando (*Cajanus cajan*) e a (*Pachyrhizi angulatus*) que foi o hospedeiro que deu o nome ao gênero do fungo. Para os Estados Unidos a maior preocupação é com relação ao kudzu (*Pueraria lobata*). Esta invasora é amplamente distribuída pelas regiões produtoras e auto-estradas neste país, sendo assim considerada uma das principais fontes de inóculo para a ferrugem. Além da ampla distribuição, esta espécie conserva o inóculo durante o inverno, pois resiste a baixas temperaturas (YORINORI et al., 2004).

2.2.4. Danos e perdas causados pelo patógeno

A ocorrência da ferrugem está diretamente associada às condições climáticas. Temperaturas médias menores que 28 °C e molhamento foliar de mais de 10 horas favorecem a infecção da planta. É por isso que nas regiões mais quentes é mais difícil aparecer a doença, ou quando aparece, não desenvolve de forma explosiva. As regiões com altitude superior a 700 metros são mais favoráveis à ocorrência da doença devido às temperaturas noturnas mais amenas associadas a um maior número de horas de orvalho. Regiões mais baixas, porém

com chuvas bem distribuídas, também são favoráveis para um desenvolvimento mais rápido da doença (YORINORI et al., 2004).

Com o aparecimento das lesões, o desfolhamento da planta é rápido resultando em redução do número de legumes, do número de grãos, e do peso dos grãos. Na África do Sul, perdas relatadas variam de até a 80 %. Em algumas áreas, houve perdas de 100 %. Os danos relativos à ferrugem da soja estão associados com a redução do número de vagens, número de grãos cheios, peso de grãos e rendimento de grãos por plantas. Além disso, o conteúdo de óleo foi reduzido, enquanto não houve alteração no teor de proteínas. Essas perdas são atribuídas a *P. pachyrhizi*, enquanto dados de pequenas perdas têm sido verificados nas Américas devido a *P. meibomiae*. A magnitude das perdas na produtividade e efeitos adversos nos componentes de produtividade têm sido correlacionados com o início da doença em relação ao estágio de crescimento do hospedeiro (OGLE et al., 1979).

2.2.5. Manejo da doença

Na ausência de cultivares resistentes, é necessário iniciar na entressafra com o manejo das plantas de soja e isso depende da região. Caso haja a possibilidade de plantas voluntárias ainda presentes no início da safra, as mesmas devem ser dessecadas. Considerando a gravidade da doença, diversos estados adotaram o “vazio sanitário”, período de 60 a 90 dias sem plantas de soja no campo, como uma estratégia para reduzir a quantidade de inóculo (esporos) na entressafra (CONSÓRCIO ANTIFERRUGEM, 2010).

Outra medida de manejo que pode ser adotada é o escalonamento de semeadura, em relação ao ciclo da cultura. As plantas precoces passam menos tempo no campo, são colhidas mais cedo e, desse modo, podem “escapar” da doença ou serem menos atingidas. Como na maioria das regiões não se tem soja no inverno, nas primeiras semeaduras o fungo iniciaria sua multiplicação, e a tendência é que o inóculo aumente com o evoluir da safra. Desse modo, a antecipação da semeadura também apresenta um mecanismo de escape quanto à concentração de inóculo.

2.2.6. Interação patógeno-hospedeiro

Em trabalho com a ferrugem do linho postulou-se a famosa teoria “gene-a-gene”, a qual afirma que para cada gene de resistência do hospedeiro, existe um gene respectivo de avirulência no patógeno. Desse modo, a interação incompatível, ou seja, resistência somente pode ocorrer se houver o reconhecimento da proteína de avirulência do patógeno pela proteína de resistência da planta (FLOR, 1956).

De acordo com o conhecimento atual da interação gene a gene, o alelo de avirulência (V) codifica uma molécula elicitora que é reconhecido por um receptor específico (codificado pelo alelo R) na planta hospedeira. O reconhecimento da molécula elicitora inicia uma rota de transdução de sinais que ativam genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade. Por outro lado, se o patógeno não possuir o gene de avirulência, este não será reconhecido pelo hospedeiro, resultando em interação compatível (susceptibilidade). A resistência só ocorre

quando o hospedeiro possui o gene de resistência (R) e o patógeno o gene de avirulência (V) correspondente (CAVALCANTI et al., 2005)

2.3. cDNA-AFLP

As respostas biológicas são controladas pela regulação da expressão gênica, sendo que, dessa forma, a identificação de um conjunto de genes diferencialmente expressos em uma determinada condição em relação à outra com a qual se deseja comparar, permite compreender os mecanismos envolvidos na manifestação de um caráter específico.

Existem inúmeras estratégias disponíveis para identificar genes diferencialmente expressos, como por exemplo, a amostragem diferencial (DDRT-PCR - *Differential Display Transcritase Reversa PCR*) de (LIANG e PARDEE, 1992), análise serial da expressão gênica (SAGE - *Serial Analysis of Gene Expression*, VELCULESCU et al., 1995), cDNA-AFLP (cDNA-AFLP - *cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms*, VOS et al., 1995 e BACHEM et al., 1996), hibridização subtrativa supressiva (SSH - *Supression Subtractive Hibridization*, DIATCHENKO et al., 1996) e microarranjos ("*Microarray*", SCHENA et al., 1995).

A técnica de cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1996) trata-se da combinação da técnica de AFLP (VOS et al., 1995) com a utilização do cDNA. O cDNA é obtido a partir da enzima transcriptase reversa, uma enzima de origem viral que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA fita-simples, a partir da cópia de uma molécula de RNA mensageiro. A técnica de cDNA-AFLP consiste em quatro etapas. Na primeira o cDNA dupla-fita é clivado com enzimas de restrição.

Na segunda, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos de cDNA gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando iniciadores especificamente desenhados para reconhecer a sequência dos adaptadores. Na quarta e última etapa, a sub-população de fragmentos amplificados é separada em gel de poliacrilamida revelados com nitrato de prata (ZABEAU, 1993).

A identificação de genes relacionados a contrastes fenotípicos tem se mostrado eficiente através do isolamento de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos. Além disso, a principal vantagem dessa técnica é o fato de que ela não necessita de prévio conhecimento da sequência e, dessa forma, é útil para a descoberta de genes ainda desconhecidos (BACHEM et al., 1996).

3. CAPITULO I

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM RESPOSTA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA PELA TÉCNICA DE cDNA-AFLP

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM RESPOSTA À FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA PELA TÉCNICA DE cDNA-AFLP

Autor: Fernando Augusto Henning

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

3.1.RESUMO - Entre os problemas que afetam a produção de soja no Brasil, a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é a mais importante. Perdas de produtividade e redução da qualidade das sementes foram relatadas, quando nenhuma medida de controle da doença foi aplicada. O desenvolvimento de cultivares resistentes além de reduzir o uso de fungicidas viabiliza a produção de semente de alta qualidade. O objetivo deste trabalho foi identificar genes relacionados à resistência à ferrugem da soja através da técnica de cDNA-AFLP na cultivar (PI459025) a qual possui genes de resistência *Rpp4*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação sendo utilizados dois tratamentos, testemunha sem a presença do patógeno e outro inoculado com o fungo, para induzir a expressão de genes relacionados a resistência a doença. Foram efetuadas coletas de folhas do terceiro trifólio de plantas inoculadas e não inoculadas em intervalos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Após a coleta, realizou-se a extração do RNA total e avaliou-se a expressão diferencial desses genes, pela técnica de cDNA-AFLP. Essa estratégia permitiu isolar 141 fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos entre plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno. Fragmentos presentes apenas no tratamento inoculado com o fungo foram extraídos dos géis, clonados, sequenciados e posteriormente comparados com genes ou proteínas presentes nos bancos de dados disponíveis. Os resultados permitiram identificar genes relacionados com a resistência a patógenos os quais podem ser apontados como fortes candidatos para resistência a doença.

Palavras chave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, genes de resistência.

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO ASIAN SOYBEAN RUST BY cDNA-AFLP TECHNIQUE

Author: Fernando Augusto Henning

Adviser: Paulo Dejalma Zimmer

3.2. SUMMARY - Among the problems that affect soybean production in Brazil, the soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*, is the most important. Productivity losses and seed quality reduction have been reported, in the absence of disease control measure. Developing resistant cultivars and reducing fungicides use enables high quality seeds production. The aim of this study was to identify genes associated with resistance to soybean rust using the technique of cDNA-AFLP for the cultivar (PI459025) which has the resistance gene *Rpp4*. The experiment was carried out in greenhouse using two treatments, control without the presence of the pathogen and one inoculated with the fungus to induce the gene expression related to disease resistance. Samples were collected from the third trifoliolate leaves of inoculated and not inoculated plants at intervals of 12, 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation. After collection, the total RNA extraction was performed and the differential gene expression was evaluated by cDNA-AFLP technique. This strategy allowed isolation of 141 cDNA fragments differentially expressed between inoculated and not inoculated with the pathogen. Fragments present only in the treatment inoculated with the fungus were extracted from gels, cloned, sequenced and then compared with genes or proteins in available databases. The results have identified genes related to pathogen resistance which can be considered as strong candidates for disease resistance.

Keywords: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, resistance genes.

3.2. INTRODUÇÃO

A ferrugem da soja é considerada uma das doenças mais destrutivas e a que causa maiores danos em várias espécies de plantas da família *Fabaceae*, provocando perdas em produtividade e em qualidade. Esse prejuízo na quantidade e na qualidade das sementes poderia ser reduzido, caso houvesse cultivares efetivamente resistentes ao ataque do patógeno.

O controle das doenças através de resistência genética é a forma mais eficiente e econômica além de ser menos agressiva ao meio ambiente. A obtenção de cultivares resistentes tem sido o foco de muitos estudos. Nesse sentido, o conhecimento do germoplasma disponível e a identificação de genes de resistência possibilitariam a introdução desse caráter em variedades modernas com elevado potencial produtivo.

Genes dominantes para resistência, denominados *Rpp1* a *Rpp4*, identificados em introduções de plantas (*PIs*) e cultivares são relatados na literatura (BROMFIELD e HARTWIG, 1980; MCLEAN e BYTH, 1980; HARTWIG, 1986). Através de marcadores moleculares, foi possível mapear três dos quatro genes de resistência previamente descritos (*Rpp1*, *Rpp2* e *Rpp4*), bem como identificar mais dois novos locos envolvidos no controle da resistência (BROGIN,

2005). No entanto, a estabilidade dessa resistência não é segura, devido à grande variabilidade do patógeno. Dezoito raças foram identificadas em amostras coletadas em plantas de soja e hospedeiros selvagens no Japão (YAMAOKA et al., 2002).

Estudos realizados em Taiwan mostraram a existência de pelo menos uma raça, contendo três genes de virulência (BROMFIELD e HARTWIG, 1980). No Brasil, estudos realizados pela Embrapa Soja identificaram 11 cultivares com resistência à ferrugem (YORINORI, 2002), sendo essa resistência quebrada rapidamente com isolado do fungo proveniente do Mato Grosso. Das quatro fontes de resistência já descritas na literatura, apenas aquelas com os genes *Rpp2* e *Rpp4* permanecem resistentes à ferrugem no Brasil (ARIAS et al., 2004).

Após o aparecimento da ferrugem asiática no Brasil foram realizados testes para identificação de fontes de resistência, em genótipos de soja adaptado às condições ambientais brasileiras, assim como em genótipos identificados como fontes de resistência em outros países (BROGIN, 2005).

Com relação ao germoplasma de outros países, ou germoplasma exótico, a exemplo das *PIs* (*Plant Introduction*) são citadas como fontes de grande potencial para resistência à ferrugem asiática. O termo *PI* é uma denominação dos acessos mantidos pelo sistema de conservação de germoplasma dos Estados Unidos da América, na tentativa de ampliar a variabilidade genética das suas cultivares (NASS et al., 2001; SANTOS, 2007).

Alguns autores defendem a idéia que o germoplasma exótico não possui utilidade imediata, devido a sua falta de adaptabilidade, o que culminaria em perdas de produtividade. Entretanto, a utilização deste tipo de germoplasma

aliada as técnicas de biologia molecular pode ajudar a entender os mecanismos envolvidos e/ou genes de resistência à ferrugem.

Quando a resistência é conferida por um ou poucos genes qualitativos, pode ser um tanto complicada para o caso da ferrugem asiática, pois o fungo *Phakopsora pachyrhizi* possui diversas raças com genes múltiplos de virulência (SINCLAIR e HARTMAN, 1996). A BRSGO 7560 é uma cultivar sujeita à quebra da resistência vertical, devido à variabilidade genética do fungo causador da ferrugem da soja (SOUZA, 2009).

Já a resistência horizontal, chamada ainda de duradoura ou raça inespecífica (AGRIOS, 2005), torna-se visível após a resistência vertical ter sido “quebrada” (PARLEVLIT, 1997) e, em geral, é poligênica e efetiva contra uma grande parte ou todas as raças do patógeno (TSCHANZ et al., 1984; AGRIOS, 2005). A resistência horizontal diminui o tamanho das lesões produzidas pelo patógeno, aumenta seu período latente e diminui o número de esporos produzidos por lesão. Nas cultivares que apresentam ou se introduz esta resistência, há uma redução na taxa de desenvolvimento da doença, pois a eficiência de infecção do patógeno é menor do que em uma cultivar suscetível, as lesões crescem mais lentamente, os esporos são produzidos mais tardiamente e em menor quantidade.

A técnica de cDNA-AFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de cDNA amplificados) é uma ferramenta eficiente para o isolamento de genes diferencialmente expressos, além de fornecer resultados reproduzíveis que foram confirmados em vários estudos (HABU et al., 1997; MAO et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi identificar genes relacionados à resistência à ferrugem da soja através da técnica de cDNA-AFLP no genótipo (PI459025).

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Produção do material vegetal

O genótipo escolhido foi a *PI* (PI459025), sendo as sementes fornecidas pelo setor de melhoramento genético de plantas da Embrapa Soja. A semeadura foi realizada em casa de vegetação e em vasos com 20 cm de diâmetro e 25 cm de altura, contendo cerca de 4,5 kg de uma mistura de solo, areia e esterco bovino, esterilizado. Antes da semeadura a casa de vegetação foi cuidadosamente higienizada com hipoclorito de sódio para retirar qualquer contaminantes que pudessem vir a influenciar o experimento. Para cada tratamento, foram utilizados vinte vasos da cultivar (PI459025), semeando-se quatro sementes por vaso. Após a emergência executou-se um raleio, deixando-se duas plantas por vaso, os quais foram casualizados sob delineamento inteiramente casualizado. Para isolar os efeitos do patógeno, a casa de vegetação foi dividida para cada um dos seguintes tratamentos:

- 1 – Vinte vasos sem inoculação da ferrugem nas plantas;
- 2 – Vinte vasos com inoculação da ferrugem nas plantas.

3.4.2. Preparo do inóculo e inoculação das plantas

Como o fungo *P. pachyrhizi* caracteriza-se por ser um parasita obrigatório, a população do patógeno foi mantida em plantas de soja suscetíveis, cultivadas em casa-de-vegetação. O procedimento para o preparo do inóculo consistiu na coleta de folhas infectadas e retiradas dos esporos (uredósporos) utilizando-se pincel esterilizado e água destilada (Figura 1). Após a obtenção da suspensão, foi realizada a contagem dos esporos em câmara de contagem de células (Neubauer), realizando-se posteriormente a diluição a fim de obter uma concentração de 3×10^5 esporos.mL⁻¹. À solução final, foi adicionado o espalhante adesivo Tween 20 na proporção de 0,5 mL.L⁻¹ de solução. As temperaturas mais altas na casa-de-vegetação durante os horários de maior insolação poderiam levar a inviabilização dos uredósporos pela falta de água livre nas folhas e pela baixa umidade do ambiente. Dessa forma, a inoculação do patógeno nas plantas foi efetuada durante o anoitecer, com auxílio de pulverizador manual. Após doze horas da inoculação, foram realizadas, durante 48 horas, aspersões constantes de água a cada hora, com duração de 15 segundos, para manter a quantidade necessária de água livre na superfície das folhas, fornecendo as condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (SINCLAIR e HARTMAN, 1996).



Figura 1. Esporos (uredósporos) do fungo (*Phakopsora pachyrhizi*), coletados a partir de folhas de soja infectadas pelo patógeno. Londrina-PR, 2008.

As plantas foram inoculadas quando atingiram o estágio V2-V3 de crescimento (trifólio completamente desenvolvido acima do segundo ou terceiro nó), (Figura 2) de acordo com a escala proposta por Fehr e Caviness (1981).

Após a inoculação foram efetuadas as coletas de quatro trifólios (dois vasos por época), para cada um dos tratamentos, em intervalos de 12, 24, 48, 72, e 96 horas após a inoculação. Imediatamente após a coleta, as folhas foram enroladas em papel alumínio, identificadas e estocadas em nitrogênio líquido, tomando-se os devidos cuidados para evitar a contaminação e degradação do material.

Esse material permaneceu estocado em ultra freezer a -80°C até o momento da extração do RNA



Figura 2. A) Inoculação de esporos do fungo (*Phakopsora pachyrhizi*) em plantas de soja do genótipo (PI459025). B) Tratamento sem inoculação. Londrina-PR, 2008.

3.4.3. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído através da utilização do reagente Trizol (Invitrogen®). Realizou-se, primeiramente, o tratamento de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos e demais utensílios necessários com água contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (H_2O_{DEPC}), para evitar a ação de enzimas que degradam o RNA (RNases). Realizou-se a desestruturação de aproximadamente 100mg do tecido vegetal (folhas), com auxílio de nitrogênio líquido.

Esse material foi transferido para um tubo de microcentrífuga onde adicionou-se 1mL de Trizol à temperatura ambiente (25°C). A mistura foi obtida em *vortex* e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, mantendo-se o tubo na posição horizontal. Centrifugou-se a amostra (12.000g/15 minutos) em temperatura de 5°C. Adicionaram-se 200µL de clorofórmio para cada mL de Trizol utilizado inicialmente e logo em seguida os tubos foram tampados e agitados vigorosamente por 15 segundos. As amostras foram incubadas por três minutos à temperatura ambiente e depois centrifugadas novamente (12.000g/15 minutos) em temperatura de 5°C.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se igual volume de isopropanol. Os tubos foram invertidos para cima e para baixo vagarosamente, iniciando a precipitação do RNA. Deixou-se a mistura em repouso, por 10 minutos a temperatura ambiente. Realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Removeu-se o sobrenadante e logo em seguida lavou-se o precipitado de RNA com etanol 75% adicionando pelo menos 1mL de etanol 75% para cada 1mL de Trizol utilizado inicialmente.

Centrifugou-se à temperatura de 4°C (7.500g/5 minutos) e removeu-se o líquido tomando cuidado para não perder o precipitado. Os tubos foram invertidos sob papel absorvente na bancada à temperatura ambiente por cinco minutos para secar o precipitado. O RNA extraído foi ressuspenso em 20µL de H₂O_{DEPC} e estocado a temperatura de – 80°C até o momento da sua utilização. A pureza e a integridade do RNA foram mensuradas através de análises de absorvância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A extração do RNA total foi realizada separadamente para cada tratamento e época de amostragem. No momento da síntese do cDNA dupla fita essas amostras de RNA de cada um dos tratamentos, provenientes de diferentes tempos ou épocas foram misturadas e homogeneizadas, originando 2 misturas de RNA, as quais foram utilizadas para a síntese do cDNA.

3.4.4. Obtenção do cDNA dupla fita

3.4.4.1. Síntese da primeira fita do cDNA

O cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando o *SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis kit* (Invitrogen®).

Para síntese da primeira fita de cDNA foram acrescentados 9µL de H₂O_{DEPC} em 50µg de RNA total (contendo RNA extraído das folhas em diferentes períodos de tempo). Em seguida, adicionou-se a cada amostra, 1µL de iniciador Oligo dT (concentração de 100pmol.µL⁻¹). Incubou-se essa mistura (Mix) (70°C por 10 minutos), e em seguida, colocou-se rapidamente o tubo no gelo. Na etapa

seguinte, realizou-se uma centrifugação breve e adicionaram-se os seguintes componentes: 4µL de tampão de reação da primeira fita 5x [Tris-HCl 250mM (pH 8,3), KCl 375mM, MgCl₂ 15mM], 2µL de DTT (1M) e 1µL de dNTP (10Mm). Essa mistura foi obtida em *vortex*, coletando-se a amostra por centrifugação breve. Em seguida, incubou-se a amostra (45°C por 2 minutos) e depois, acrescentou-se 2µL de SuperScript II RT, incubando-se novamente a amostra (45°C por 1h). O último passo foi manter a amostra no gelo para finalizar a reação.

3.4.4.2. Síntese da segunda fita do cDNA

Em banho de gelo, acrescentou-se 20µL de reação da primeira fita, com os seguintes componentes: 91µL de H₂O_{DEPC}, 30µL de tampão de reação da segunda fita 5x [Tris-HCl 250mM (pH 6,9), MgCl₂ β-NAD⁺ 450mM, (NH₄)₂SO₄ 50mM], 3µL de dNTP (10Mm) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1µL de DNA *Ligase* da *Escherichia coli* (10U/µL), 4µL DNA Polimerase da *E. coli* (10U/µL), 1µL RNase H da *E. coli* (2u/µL). A mistura foi obtida em *vortex* e incubada (16°C por 2h). Em seguida, adicionaram-se 2µL (10 unidades) de T4 DNA Polimerase e incubou-se por mais 5 minutos. Transferiu-se a amostra para o gelo e adicionou-se 10µL de EDTA 0,5M e 160µL de fenol:clorofórmio: álcool isoamilico (25:24:1). Homogeneizou-se a amostra em *vortex* e centrifugou-se (14.000g em temperatura ambiente). Removeu-se 140µL do sobrenadante e transferiu-se para um novo tubo de microcentrífuga. No passo seguinte, adicionaram-se 70µL de NH₄OAc e 0,5mL de etanol absoluto gelado. A mistura foi obtida em *vortex* e imediatamente centrifugou-se por 20 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Removeu-se o sobrenadante lavando-se o precipitado em etanol 70%.

Centrifugou-se novamente (14.000g/2 minutos) e descartou-se o sobrenadante. Finalmente o cDNA foi incubado a 37°C para evaporar o resíduo de etanol e depois, dissolveu-se o precipitado em 6µL de água ultrapura.

3.4.5. cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP é composta pelas etapas de digestão do cDNA com enzimas de restrição (*EcoR I* e *Mse I*), ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de cDNA gerados pela clivagem, pré-amplificação dos fragmentos de restrição utilizando os iniciadores (*EcoR I +A* e *Mse I +C*), amplificação seletiva de fragmentos utilizando três bases seletivas (Tabela 1) e eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados em gel de poliacrilamida. Para execução dessa técnica utilizou-se o *AFLP Starter Primer Kit* (Invitrogen®). Nos próximos parágrafos, estão detalhados os passos que compõem cada uma dessas etapas.

3.4.5.1. Reação de digestão do cDNA

Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados os seguintes componentes: 3µL de tampão de reação 5x [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), acetato de magnésio 250mM, acetato de potássio 50mM], 3µL de cDNA (150ng), 1,2µL *EcoR I/Mse I* [1,25u/µL em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, 0,1mg/µL BSA, glicerol 50% (v/v), 0,1% Triton® x-100], 7,8µL de água ultrapura. Essa mistura foi homogeneizada e o conteúdo coletado através de centrifugação breve. Em seguida incubou-se a amostra (37°C por 2h) e depois,

incubou-se novamente (70°C por 15 minutos) para inativar a restrição por endonucleases. O último passo foi colocar o tubo no gelo e coletar o conteúdo por centrifugação breve.

3.4.5.2. Ligaç o de adaptadores

Ao cDNA digerido proveniente da etapa anterior, adicionaram-se 14,4 L de solu o de liga o de adaptadores [adaptadores *EcoR I/Mse I*, ATP (0,4mM), Tris-HCl 10mM (pH 7,5), acetato de magn sio 10mM, acetato de pot ssio 50mM] e 0,6 L de T4 DNA *Ligase* [1u/ L em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), DTT 1mM, KCl 50mM, glicerol 50% (v/v)]. Homogeneizou-se a mistura, coletou-se o cont do da rea o atrav s de centrifuga o breve e incubou-se amostra (20°C por 2h). Em seguida, realizou-se uma dilui o da solu o de liga o de 1:10 colocando 10 L da rea o de liga o e acrescentando 90 L de tamp o TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

3.4.5.3. Pr -amplifica o

Em um microtubo de 0,2mL, foram adicionados 3 L do cDNA dilu do da etapa anterior, 20 L do *primer mix* pr -amplifica o, 2,5 L de tamp o da PCR 10x+Mg [Tris-HCl 200mM (pH 8,4), MgCl₂ 15mM, KCl 500mM] e 0,5 L da enzima *Taq* DNA Polimerase (5u/ L). Em seguida, a amostra foi levada ao termociclador utilizando-se a seguinte programa o: 20 ciclos de (94°C por 30s; 56°C por 60s e 72°C por 60s). Ap s a PCR, realizou-se uma dilui o dessa amostra pr -

amplificada transferindo-se 3µL da amostra e adicionando-se 147µL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

3.4.5.4. Amplificação seletiva

Na reação de amplificação seletiva foram testadas 25 combinações de iniciadores disponíveis no kit (Tabela 1).

Tabela 1. Combinações de iniciadores testados nas reações de amplificação seletiva no genótipo (PI459025) infectado e não infectado pelo fungo, sendo *M* o iniciador complementar ao sítio de restrição da enzima *Mse* I e *E* o iniciador complementar ao sítio de restrição da enzima *EcoR* I.

	<i>M</i> -CAA	<i>M</i> -CAC	<i>M</i> -CAG	<i>M</i> -CAT	<i>M</i> -CTA	<i>M</i> -CTC	<i>M</i> -CTG	<i>M</i> -CTT
<i>E</i> -ACA							√	
<i>E</i> -ACC	√	√	√	√	√		√	√
<i>E</i> -ACG	√		√	√	√	√	√	
<i>E</i> -ACT	√			√			√	
<i>E</i> -AGC	√	√	√	√	√		√	√
<i>E</i> -AGG		√						

Para cada par de iniciadores escolhidos foi necessário o preparo das seguintes soluções:

Mix 1: + 1,0µL do iniciador *EcoR* I
+ 9,0µL do iniciador *Mse* I (contendo dNTPs)
Total = 10µL (suficiente para 2 reações de amplificação)

Mix 2: 15,8µL de água ultrapura

+ 4,0µL de tampão de PCR (10X+Mg)

0,2µL de Taq DNA Polimerase (5u/µL)

Total = 20µL (suficiente para 2 reações de amplificação)

Mix 3: 5,0µL de cDNA diluído

+ 5,0µL de *mix 1*

10,0µL de *mix 2*

Total = 20µL (suficiente para 2 reações de amplificação)

Após o preparo das reações de amplificação seletiva, as amostras foram levadas ao termociclador (PTC 100–MJ Research) com a programação apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Programação do termociclador utilizada na reação de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.

Programa	T(°C)	Tempo(s)	T(°C)	Tempo (s)	T(°C)	Tempo (s)	Nºciclos
1	94	60	65	60	72	90	1
2	94	60	64	60	72	90	1
3	94	60	63	60	72	90	1
4	94	60	62	60	72	90	1
5	94	60	61	60	72	90	1
6	94	60	60	60	72	90	1
7	94	60	59	60	72	90	1
8	94	60	58	60	72	90	1
9	94	60	57	60	72	90	1
10	94	60	56	60	72	90	1
11	94	30	56	30	72	60	23

3.4.6. Detecção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos

Para visualização dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (5% de concentração) revelado com nitrato de prata. Essa metodologia é a mais utilizada para separação de proteínas e moléculas de pequeno tamanho. No caso da técnica de AFLP, utilizam-se géis do tipo desnaturante, que realizam a separação de fragmentos de cDNA de fita simples.

3.4.6.1. Preparo e montagem das placas

O gel de acrilamida foi preparado entre duas placas de vidro com comprimentos diferentes, utilizando-se espaçadores com 2mm de espessura. A placa maior recebeu um tratamento com uma solução de *Bind silane* que faz com que o gel permaneça aderido à placa no momento da revelação, enquanto a placa menor recebeu tratamento com uma solução repelente de *Repel silane* que permite que a placa menor desprenda-se com facilidade do gel após a eletroforese.

3.4.6.2. Preparo da solução do gel de poliacrilamida (5%)

A solução do gel foi preparada utilizando-se os seguintes componentes:

- 22,5g de uréia;

- 10mL de TBE 5x (54g Tris-Base, 27,5g Acido Bórico, 20mL EDTA 0,5M (pH 8,0), completou-se com água deionizada até 1L e ajustou-se o pH do tampão até próximo a 8,3);
- 7,5mL de acrilamida:bisacrilamida 19:1 (38g de acrilamida, 2g de bisacrilamida completar até 100mL);
- Água deionizada quantidade suficiente para 50mL.

Os componentes foram dissolvidos em agitador magnético até a diluição total da uréia. Depois de a solução esfriar, acrescentou-se 360 μ L de APS (Persulfato de Amônio 10%) e 72 μ L de TEMED, e imediatamente verteu-se a solução no molde do gel.

Após a polimerização do gel, realizou-se uma pré-corrída em potência constante (60W) por aproximadamente 30 minutos. Em seguida procedeu-se a lavagem da região superior do gel injetando tampão com o auxílio de uma seringa. Antes da aplicação das amostras no gel, realizou-se uma desnaturação a 94°C por cinco minutos, utilizando igual volume de tampão de desnaturação (*loading buffer*). Após a desnaturação, as amostras foram imediatamente resfriadas a 4°C e aplicadas no gel. Após duas horas de corrida (60W), retirou-se a placa da cuba de eletroforese e iniciou-se o processo de revelação.

3.4.6.3. Revelação do gel com nitrato de prata (BEIDLER, 1982; CRESTE, 2001).

Esse método de revelação é baseado na oxidação do nitrato de prata ligado aos fragmentos de cDNA amplificados, presentes no interior do gel. Primeiramente retirou-se a placa menor na qual foi aplicada a solução repelente.

A placa maior na qual o gel estava aderido foi colocada em solução fixadora I (100mL de etanol (PA), 10mL de ácido acético (PA), completou-se o volume até 2L com água destilada), durante 20 minutos sob agitação orbital leve. Eliminou-se a solução fixadora I e realizou-se duas lavagens de cinco minutos com água destilada . Descartou-se a água de lavagem e em seguida foi acrescentada a solução fixadora II (15mL de ácido nítrico e completou-se o volume até 2L com água destilada) deixando sob agitação orbital leve durante três minutos. A solução fixadora II foi eliminada procedendo-se em seguida, duas lavagens de cinco minutos com água destilada. Acrescentou-se a solução de nitrato de prata (4g de nitrato de prata em água destilada, aprox. 200mL, depois se completou o volume até 2L com água destilada), deixando sob agitação orbital leve durante 30 minutos. Eliminou-se essa solução e procedeu-se uma lavagem rápida de 30 segundos com água destilada. Após eliminar a água de lavagem foram acrescentados 500mL da solução reveladora gelada (4°C) (60g de carbonato de sódio dissolvidos em 500mL de água destilada, sob agitação constante, completando-se o volume até 2L com água destilada gelada). Imediatamente antes da utilização da solução reveladora, acrescentou-se 1mL de formaldeído) até adquirir uma coloração preta. Eliminou-se os 500mL e adicionou-se o restante da solução reveladora deixando sob agitação orbital constante até o aparecimento das bandas. Retirou-se a solução reveladora e acrescentou-se a solução finalizadora (200mL de ácido acético 10% e completou-se o volume até 2L com água destilada), deixando sob agitação orbital leve até parar de formar bolhas. Eliminou-se a solução finalizadora e adicionou-se água destilada até a total cobertura do gel. Esperou-se o gel secar e finalmente foram identificadas as bandas polimórficas entre as plantas inoculadas e não inoculadas.

3.4.7. Resgate e purificação das bandas selecionadas

Fragmentos de cDNA presentes como bandas fortes apenas nas plantas inoculadas e ausentes nas não inoculadas (controle), foram recortados do gel com auxílio de lâminas. Os fragmentos de gel foram imersos em 20µL de água ultrapura permanecendo em banho de gelo, por um período de 10 minutos. As amostras foram aquecidas a 95°C por 15 minutos e em seguida, resfriadas novamente no gelo. Após uma centrifugação breve, o sobrenadante foi removido para ser utilizado na reação de reamplificação. A reação de reamplificação foi realizada utilizando-se 5µL do DNA recuperado e um volume final de reação de 20µL seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.4.

3.4.8. Clonagem dos fragmentos de cDNA reamplificados

3.4.8.1. Reação de ligação

Os fragmentos de cDNA reamplificados foram clonados utilizando o vetor TOPO TA *Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen) (Figura 4). A reação de ligação foi efetuada adicionando-se 1µL de solução salina diluída 1:4, 0,5µL cDNA, 0,5µL do vetor, completou-se com água ultrapura até volume final de 5,5µL.

3.4.8.2. Transformação por eletroporação

A transformação foi efetuada através de eletroporação em células de *E. coli* Top 10 F. Acrescentou-se 2µL da solução de ligação em uma alíquota de 70µL de células competentes. Colocou-se a amostra no eletroporador ajustado a 25µF (capacitância), 200Ω (resistência), 2,5KV (voltagem). Acrescentou-se 1mL de meio LB e incubou-se no *shaker* por 1h a 37°C. Acrescentou-se o cultivo em 2 placas (uma com 50µL e outra com 950µL do cultivo), cada placa contendo 20mL de LB sólido, 20µL de Kanamicina (50mg.mL⁻¹), 40µL de x-gal (20mg.mL⁻¹) e 20µL de IPTG (0,3 Molar). Posteriormente incubaram-se as placas em câmara BOD 37°C.

3.4.8.3. Seleção das colônias transformadas e extração do DNA plasmidial

Na manhã seguinte, efetuou-se a seleção das colônias transformadas através da visualização da coloração, sendo as colônias brancas as que possuíam o fragmento de interesse e as colônias azuis as que não continham o inserto.

Foram selecionadas três colônias brancas e uma colônia azul (controle) para cada fragmento de cDNA diferencialmente expresso, selecionado do genótipo de soja inoculado com o fungo. A cada colônia foram acrescentados 3mL de meio LB com antibiótico (1µL Kanamicina /1mL de LB). Incubou-se no *shaker* a 37°C até o dia seguinte e posteriormente realizou-se a extração do DNA plasmidial com a utilização do FlexiPrep™ Kit (GE Healthcare).

Após a extração do DNA plasmidial, as amostras foram digeridas com as enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III. Comparou-se o tamanho dos insertos liberados nas colônias brancas com os respectivos controles (colônias azuis), a fim de verificar se a ligação foi efetuada com sucesso.

3.4.9. Sequenciamento dos fragmentos de cDNA e análise *in silico*

O sequenciamento das amostras foi realizado na Embrapa soja em equipamento MegaBACE 500 DNA sequencer (GE Healthcare) utilizando a tecnologia Dynamic ET-terminator. Ambas as extremidades das fitas foram sequenciadas utilizando-se três repetições. Com relação a análise *in silico*, primeiramente realizou-se o tratamento das sequências utilizando o programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) afim de remover parte das sequências pertencentes ao vetor. Em seguida, com auxílio do programa ContigExpress® Vector NTI 10.0 suite (Invitrogen), as sequências senso e anti-senso resultantes de cada amostra, foram agrupadas em *contigs* e posteriormente comparadas com genes/proteínas depositadas em bancos de dados. Para a busca das homologias entre as sequências de cDNA e as sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), SoyBase (<http://www.soybase.org/>), e EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) foi utilizada a estratégia do alinhamento local através do programa computacional BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

A seleção das homologias foi baseada na estatística *E-value*, a qual calcula a probabilidade de que o alinhamento entre sequências tenha ocorrido ao

acaso. Para este estudo foi considerado um ponto de corte rigoroso, com valores de *E-value* inferiores a $1e^{-10}$.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das etapas essenciais para se obter sucesso na técnica de cDNA-AFLP é escolher um método que assegure extrair RNA total em quantidade e qualidade suficiente.

Primeiramente foi testado o reagente *Pure Link Plant RNA* (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante, no entanto, este protocolo extraiu DNA junto às amostras de RNA, o que comprometeria a pureza e a integridade das amostras.

Sendo assim, um segundo protocolo foi testado baseando-se na utilização do reagente *Trizol*, conforme descrito no item 3.3.

De acordo com a figura 3 pode-se constatar que este produto garantiu a extração de RNA sem contaminação e em quantidade e qualidade suficientes para a obtenção do cDNA dupla-fita.

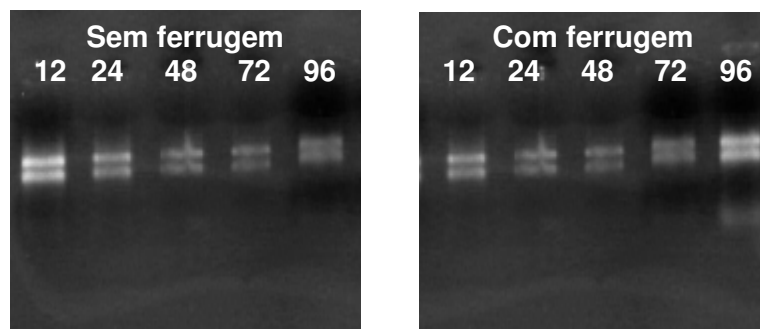


Figura 3. RNA total extraído de folhas de soja provenientes de plantas com e sem infecção pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, em diferentes períodos de tempo (horas), utilizando o reagente Trizol (Invitrogen).

Após a extração partiu-se para obtenção do cDNA dupla fita e em seguida avaliou-se o polimorfismo pela técnica de AFLP. Nos géis se preconizou em aplicar três repetições, para cada uma das combinações de iniciadores avaliadas e como pôde-se observar, o padrão de bandagem ficou bem nítido permitindo uma seleção clara das bandas polimórficas (Figura 4).

Das 25 combinações de iniciadores AFLP utilizadas (Tabela 3), 17 apresentaram um total de 141 fragmentos (bandas) polimórficas entre plantas infectadas e não infectadas pelo ataque do fungo. Nas combinações 17, 13, 19 e 30 geraram 26, 20, 16 e 14 fragmentos polimórficos respectivamente. O restante das combinações apresentaram menos de dez fragmentos polimórficos.

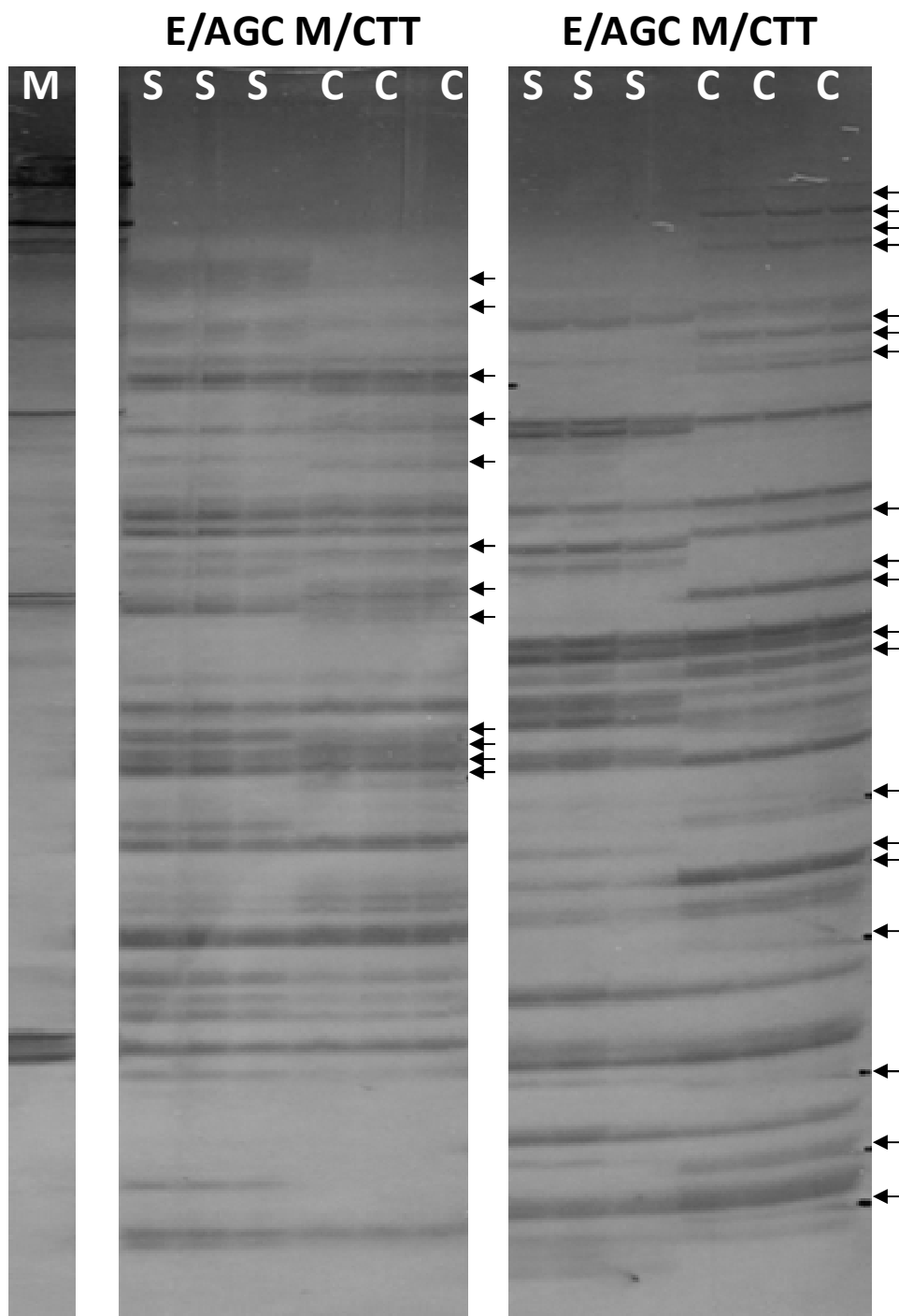


Figura 4. cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, no genótipo (PI459025) com e sem infecção pelo fungo causador da ferrugem da soja. Para duas combinações de primer. Marcador de peso molecular 1Kb. Setas indicam genes diferencialmente expressos.

Tabela 3. Número de fragmentos polimórficos obtidos de acordo com diferentes combinações de iniciadores do kit de AFLP, entre genótipo infectado e não infectado com ferrugem.

Denominação	Iniciador E	Iniciador M	Número bandas
1	ACC	CTT	6
3	ACC	CAG	7
4	ACG	CAA	8
5	ACA	CTG	7
8	ACG	CAG	2
9	ACC	CAC	1
10	ACG	CAT	4
11	AGG	CAC	4
12	ACC	CTA	5
13	AGC	CTA	20
14	ACG	CTA	11
15	ACC	CAA	4
16	ACT	CAT	4
17	ACG	CAA	26
18	ACC	CTG	2
19	ACT	CTG	16
30	AGC	CTT	14
Total	-	-	141

Após a detecção e identificação dos fragmentos polimórficos, ou seja, presentes no tratamento com infecção pelo patógeno e ausentes no tratamento controle, todos os géis foram escaneados e posteriormente realizou-se o resgate dos fragmentos polimórficos. Dos 141 fragmentos polimórficos, conseguiu-se reamplificar 84, pois muitos se apresentavam em concentração muito baixa. A figura 5 serve para exemplificar um padrão de amostras reamplificadas, assim como amostras aonde não se conseguiu reamplificar (13i e 13o)

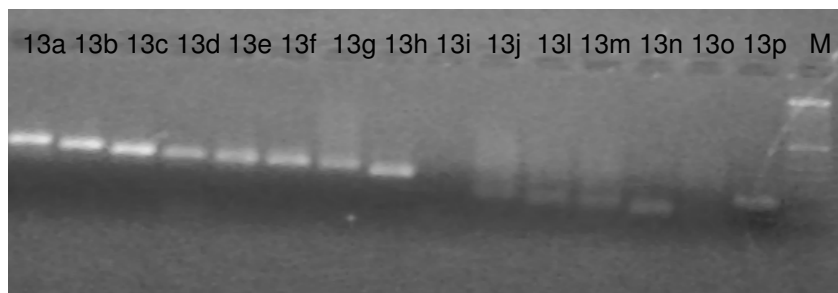


Figura 5. Bandas oriundas da técnica de cDNA-AFLP, resgatadas do gel de poliacrilamida e reamplificadas. M – marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

Após a seleção dos fragmentos amplificados, de acordo com a concentração (estimada visualmente pelo gel), partiu-se para a etapa da clonagem. Do total de 84, conseguiu-se clonar com sucesso, 68 fragmentos reamplificados, entretanto devido ao pequeno tamanho dos mesmos, não se pôde observar diferença (Figura 6) entre as amostras provenientes dos controles (colônias azuis) e as amostras em que houve a clonagem dos fragmentos de interesse (colônias brancas). Nesse caso, realizou-se a digestão das amostras com as enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III a fim de comparar o tamanho dos insertos liberados em cada uma das amostras (Figura 7).

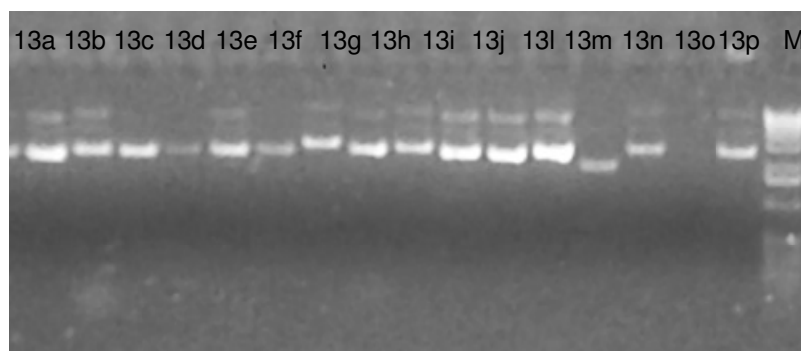


Figura 6. DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes utilizando o FlexiPrep™ Kit (GE Healthcare) e visualizado em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio. C – controle.

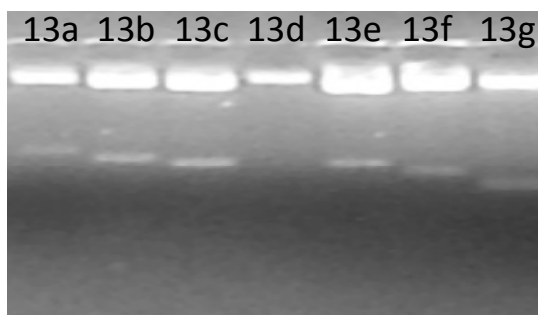


Figura 7. DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes, digerido com enzimas de restrição *Xba* I e *Hind* III e visualizado em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio.

Em apenas quatro das 64 amostras não obteve-se sucesso na clonagem, sendo assim, foram encaminhadas 60 amostras para o sequenciamento.

Na análise dos produtos do sequenciamento, preconizou-se por utilizar aquelas amostras que formassem um *contig* de no mínimo 100 nucleotídeos. Oito *contigs* ficaram com tamanho abaixo de 100 nucleotídeos, sendo seis com 86 nucleotídeos e dois com 74. Cerca de oito sequências não formaram *contig*, pois não houve sobreposição das sequências *forward* e *reverse*. Outras 24 amostras necessitam ser resequenciadas. No total foi alcançado sucesso em 40 amostras, pois estas formaram *contigs* com mais de 100 nucleotídeos e oriundos de três repetições nos sentidos *forward* e *reverse*.

Após o alinhamento local destas 40 amostras (Tabela 4), pôde-se ver se estas alinhavam com proteínas e/ou genes relacionados aos mecanismos de resistência da soja, em resposta ao ataque do fungo causador da ferrugem asiática.

Tabela 4. Sequências disponíveis em bancos de dados que apresentaram similaridade com fragmentos de cDNA-AFLP diferencialmente expressos em resposta a ferrugem da soja, no genótipo de soja (PI459025).

Amostra	N° acesso	Gene	e-value	Função
15 A1	gb ABS18413.1 	<i>WRKY</i>	5e-62	Resistência a patógenos
12 F1	EU450800.1	<i>NBS-LRR</i>	5e-13	Resistência a patógenos
13 D2	gb EU450800.1 	<i>NBS-LRR</i>	2e-76	Resistência a patógenos
13 E2	gb EU450800.1 	<i>NBS-LRR</i>	3e-26	Resistência a patógenos
17 G2	gb EU450800.1 	<i>NBS-LRR</i>	7e-80	Resistência a patógenos
17 H1	gb EU450800.1 	<i>NBS-LRR</i>	7e-34	Resistência a patógenos
04 A1	gb ACM89637.1 	<i>NBS-LRR</i>	1e-16	Resistência a patógenos
09 C1	gb ACM89623.1 	<i>NBS-LRR</i>	7e-10	Resistência a patógenos
12 E1	gb ACM89623.1 	<i>NBS-LRR</i>	2e-76	Resistência a patógenos
30 A1	FJ014837.1	<i>NBS-LRR</i>	1e-94	Resistência a patógenos
13 G2	gb CD396376.1 	<i>Salicylic acid</i>	5e-64	Resistência sistêmica adquirida
15 B1	gb ABW23439.1 	<i>MSI1</i>	3e-28	Desenvolvimento do tricoma
30 L1	AY942816.1	<i>Putative plastid glucose 6</i>	1e-25	Transporte de glucose 6 phosphate
17 C1	AY942816.1	<i>Putative plastid glucose 6</i>	2e-69	Transporte de glucose 6 phosphate
01 A2	gb ACN78973.1 	<i>Rpp4C2</i>	2e-98	Resistência a patógenos
16 B2	gb ACN78964.1 	<i>Rpp4C1</i>	2e-63	Resistência a patógenos
12 D1	gb ACN78973.1 	<i>Rpp4C2</i>	7e-10	Resistência a patógenos
12 A1	gb AF180335.1 	<i>Mdh1</i>	5e-98	Converte de malato à oxaloacetato

Das 40 sequências, apenas 18 alinharam com genes ou proteínas com função conhecida.

A sequência 15 A1 alinhou com genes da família *WRKY*, as quais pertencem a uma superfamília de fatores de transcrição envolvidos em diversos processos fisiológicos das plantas, inclusive em mecanismos de defesa contra

patógenos (ZHANG e WANG 2005). Utilizando PCR em tempo real, para estudar a ferrugem do café, foram encontradas nas reações de resistência, um aumento relativo de 15 vezes na expressão do gene *WRKY1* de café no intervalo de 12 a 16 horas pós-inoculação (GANESH et al., 2006). Em trabalho com ferrugem da soja foram encontrados 46 fatores de transcrição *WRKY* no genótipo resistente (PI230970) em resposta ao ataque do fungo (VAN de MORTEL et al., 2007). Estes autores comparando a resposta de defesa de plantas susceptíveis (Embrapa 48) e resistentes ao ataque do fungo observaram que os resistentes começam a expressar as *WRKY* um dia antes das plantas susceptíveis. Em plantas de *Arabidopsis*, as proteínas *WRKY* aparecem na cascata de eventos que iniciam a resistência sistêmica adquirida, a qual produz proteínas PR1 como produto final (EULGEM, 2005). Segundo este autor as PR1 são marcadores bem caracterizados envolvidos no mecanismo de resposta ao ataque de patógenos o que pode ser uma ferramenta muito útil nos programas de melhoramento genético que se utilizam da SAMM (seleção assistida por marcadores moleculares).

Outras nove sequências do trabalho alinharam genes da família *NBS-LRR*. O maior grupo de genes de resistência (R) de plantas já clonados codifica para proteínas com um domínio de ligação a nucleotídeos (*NBS - Nucleotide Binding Sites*) na região N-terminal, e para uma região com repetições ricas em leucina (*LRR – Leucine Rich Repeat*) no C-terminal. Genes desta classe conferem resistência a diversos patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides (ROSSI et al., 1998). Enquanto a região LRR é muito variável, a região NBS apresenta “motivos conservados” (KOBÉ e DEISENHOFER, 1994). Grande parte das respostas efetivas de resistência a patógenos está vinculada à presença de genes de resistência (genes R) nas plantas. O produto de expressão dos genes R

atua como receptores diretos ou indiretos a fatores de avirulência (*avr*) específicos dos patógenos. Os genes R, uma vez ativados, desencadeiam cascatas de transdução de sinal que culminam com o fenótipo de resistência.

Trabalhos conduzidos em cevada utilizando iniciadores degenerados para *NBS-LRR* sugeriram que as sequências nucleotídicas amplificadas e o produto de tradução potencial das mesmas, indicaram similaridade com genes de resistência conhecidos, sendo denominados análogos a genes de resistência (*RGAs* - *Resistance Gene Analogs*) (MADSEN et al., 2003). Alguns destes *RGAs* estão geneticamente ligados a locos de genes de resistência ou parte dos mesmos. Estes genes *NBS-LRR* encontrados neste trabalho são fortes candidatos para entrarem em programas de melhoramento que visem seleção de genótipos resistentes ao ataque do fungo causador da ferrugem da soja.

A sequência 13 G2 apresentou similaridade com gene da rota do ácido salicílico. O ácido salicílico promove a resistência sistêmica adquirida (RSA) nas plantas em resposta ao ataque por patógenos. A indução de RSA resulta na restrição do crescimento de fitopatógenos e com isso ocorre à supressão ou diminuição dos sintomas das doenças, em razão da ativação de mecanismos de resistência das plantas, associadas à expressão coordenada de um conjunto de genes de defesa (RYALS, et al., 1996).

O ácido salicílico foi eficiente em controlar algumas doenças foliares da soja, dentre elas, a ferrugem, e a eficiência foi influenciada pela cultivar e época de aplicação, com os melhores resultados obtidos nas pulverizações realizadas quando ainda não haviam sido observados os sintomas da doença (DALLAGNOL et al., 2006).

A sequência 15 B1 apresentou similaridade com genes *MSI1*, os quais existem em todos os eucariotos e funcionam como subunidades de diversos complexos protéicos (HENNIG et al., 2005). Em experimento com plantas transgênicas de *Arabidopsis*, observou-se que a *MSI1* estava envolvida no desenvolvimento do tricoma (EXNER et al., 2008). Dentre os mecanismos de resistência, os tricomas e os tecidos lignificados funcionam como barreira mecânica à invasão do fungo. Em plantas de soja atacadas pela ferrugem foi observada abundância de tricomas principalmente na face abaxial, além de cutícula espessada na folha (MUSSURY et al., 2007). Provavelmente os tricomas agem evitando o acúmulo de água sobre a superfície da folha da planta hospedeira, para evitar assim a germinação dos esporos fúngicos.

As sequências 17 C1 e 30 L1 apresentaram homologia com proteína *Glycine max putative plastide glucose 6 phosphate*. Durante a senescência das folhas, ou seja, transição de autotrofia para heterotrofia, os plastídeos apresentam elevado conteúdo de *glucose phosphate translocator* (GPT), que ativa e armazena amido usando a *glucose 6 phosphate* como substrato, como ocorre em plastídeos de sementes (QUICK et al., 1995). O estado do açúcar é um sinalizador para o metabolismo que diferencia o plastídeo (WEBER et al., 2005). Esta proteína não apresentou relação direta com mecanismos de resistência, mas isto pode ocorrer frequentemente, já que nem sempre, todos os genes diferencialmente expressos estão relacionados diretamente o objeto de estudo.

As sequências 12 D1, 1 A2 e 16 B2 apresentaram homologia com os genes *Rpp4* (*Rpp4C2* (Wm82) e *Rpp4C1* (Wm82)). Os genes *Rpp4* pertencem a famílias de genes *Coiled-Coil* (CC), *Nucleotide Binding Site* (NBS) and *Leucine Rich*

Repeat (LRR) as quais são famílias relacionadas à resistência a doenças em plantas (MEYER et al., 2009).

Domínio NBS é necessário para a ligação entre ATP / GTP e funciona como uma molécula sinalizadora (TAMELING et al., 2002), assim como o domínio CC (RAIRDAN et al., 2008). Em contrapartida, o LRR fornece uma ligação potencial superfície de interações proteína-proteína (JONES e JONES, 1997).

O sequenciamento do DNA genômico da variedade resistente (PI459025B) e da suscetível Willians82 (Wm82) confirmou a presença de cinco (*Rpp4C1*, *Rpp4C2*, *Rpp4C3*, *Rpp4C4* e *Rpp4C5*) e de três (*Rpp4C1*, *Rpp4C2* e *Rpp4C3*) genes candidatos nesses genótipos, respectivamente. O alinhamento entre os genes *Rpp4C1*, *Rpp4C2* e *Rpp4C3* da cultivar (PI459025B) apresentam elevada identidade de nucleotídeos (95, 99 e 99%) com os genes *Rpp4C2* e *Rpp4C3* do genótipo (Wm82). Já o gene *Rpp4C4* (PI459025B) apresentou identidade superior a 98% com os genes *Rpp4C2* e *Rpp4C3* (Wm82) (MEYER et al., 2009).

Vale dizer que mesmo tendo genes *Rpp4* (*Rpp4C1*, *Rpp4C2* e *Rpp4C3*) em comum entre os genótipos resistente (459025B) e susceptível (Wm82), há um número de duplicações ou de recombinações desiguais que levam a uma diferença no número e tamanho destes genes, entre estes genótipos (MEYER et al., 2009).

A diferença de tamanho entre os genes dos dois genótipos é pequena, mas podem desempenhar um papel chave na resistência. Em trabalho estudando resistência a brusone em arroz, observou-se que uma alteração em um único aminoácido LRR resultava em susceptibilidade (BRYAN et al., 2000).

Através de estratégia de silenciamento de genes (VIGS - *Virus-induced gene silencing*), Meyer et al. (2009), confirmaram que o gene *Rpp4C4* (PI459025B) não está presente na cultivar susceptível e este foi apontado como principal gene *Rpp4* candidato envolvido na resistência à ferrugem asiática da soja.

A frequência de ocorrência de genes candidatos *Rpp4* é muito baixa, pois o custo para o metabolismo da planta para manter genes *Rpp4* na ausência da doença é muito alto (MEYER et al., 2009). Trabalho conduzido avaliando a produtividade em quatro genótipos de *Arabidopsis* em ambientes livres de patógenos demonstrou que os genótipos que apresentavam o gene *RPM1* de resistência a *Pseudomonas syringae* produzia 9% a menos que genótipos sem o gene *RPM1* (TIAN et al., 2003).

A sequência 12 A1 apresentou homologia com o gene *Mdh1* que codifica a enzima malato desidrogenase. Esta enzima catalisa a conversão de malato à oxalacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e outros compartimentos celulares (SPINOLA et al., 2000).

Em trabalho avaliando-se o efeito do ataque de nematóides em melão, evidenciou-se aumento na intensidade de bandas e no número de alelos da malato desidrogenase, sugerindo então a relação desta enzima com a ativação de genes que podem estar relacionados a mecanismos de defesa da planta ao patógeno (MEDEIROS, 2007).

Nesse sentido, a infecção de sementes de milho com os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium* sp. alterou tanto a intensidade quanto o

número de bandas, dos padrões eletroforéticos da isoenzima malato desidrogenase (SILVA et al., 2000).

3.6. CONCLUSÕES

A técnica de cDNA-AFLP apresenta eficiência para obtenção de genes diferencialmente expressos no genótipo (PI459025), em resposta à ferrugem asiática da soja.

Os genes *WRKY*, *NBS-LRR*, *salicylic acid*, *MS1*, *Putative plastid glucose 6*, *Rpp4C1*, *Rpp4C2* e *Mdh1* são expressos em resposta à infecção das plantas de soja com *Phakopsora pachyrhizi*.

4. CAPÍTULO II

EFEITO DE FUNGICIDAS UTILIZADOS NO CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NA QUALIDADE DE SEMENTES

EFEITO DE FUNGICIDAS UTILIZADOS NO CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA NA QUALIDADE DE SEMENTES

Autor: Fernando Augusto Henning

Orientador: Paulo Dejalma Zimmer

4.1. RESUMO - A cultura da soja pode sofrer com ataque de um grande número de patógenos, destacando-se entre estes os fungos. Uma doença que têm afetado as plantas de soja no campo e por conseqüência, o rendimento de sementes é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* causador da ferrugem da soja. Além disso, as sucessivas aplicações de fungicidas necessárias para o controle da doença podem provocar um efeito residual desses produtos na planta, podendo afetar a qualidade fisiológica das sementes. Por outro lado a utilização de fungicidas foliares pode contribuir para diminuir a incidência de fungos associados as sementes. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de aplicações de fungicidas utilizados no controle da ferrugem da soja na qualidade sanitária e fisiológica de sementes. O experimento foi conduzido na estação de cultivo 2008/09 no campo experimental da Embrapa Soja em Londrina PR. O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso com quatro repetições. Foram utilizados 15 tratamentos (Priori Xtra+Nimbus; Artea; Virtue; Impact125SC+agefix; Caramba; Opera+Assist; Folicur; Orius; Domark100EC+Aqtem; Eminent; Tebuco NORTOX; Impact Duo+Agefix; Sphere; Nativo+Aureo; Aproach Prima+Nimbus) mais uma testemunha (sem fungicida). O efeito residual dos fungicidas foi avaliado pelo teste de germinação, envelhecimento acelerado e pelo teste de sanidade de sementes. De acordo com os resultados, os tratamentos utilizados para o controle da ferrugem da soja não prejudicaram a qualidade fisiológica das sementes. Os tratamentos Impact125SC+agefix e Impact Duo+Agefix garantiram sementes livres de *Cercospora kikuchii*.

Palavras-chave: *Glycine max*, germinação, sanidade, tratamento químico.

FUNGICIDES USED TO CONTROL ASIAN SOYBEAN RUST AND THEIR EFFECT ON SEED QUALITY

Author: Fernando Augusto Henning

Adviser: Paulo Dejalma Zimmer

4.2.SUMMARY - Soybean crop may be affected by a large number of pathogens, especially fungi attack. A disease that has affected soybean plants in the field and consequently seed yield is the fungus *Phakopsora pachyrhizi* which causes soybean rust. Moreover, successive fungicides application to control the disease can cause a residual effect, which may affect the seed physiological quality. Furthermore the use of foliar fungicides can help to reduce the seeds fungi incidence. The aim of this study was to evaluate the effect of fungicide applications to control soybean rust on the seed sanitary and physiological quality. The experiment was carried out in 2008/09 crop season at Embrapa Soja in Londrina PR. The design was randomized blocks with four replications. A total of 15 treatments (Priori Xtra + Nimbus; Artea; Virtue; Impact125SC + agefix; Caramba; Opera + Assist, Folicur, Orius; Domark100EC + Aqtem; Eminent; Tebuco Nortox; Impact Duo + Agefix; Sphere; Native + Aureo; Aproach Press + Nimbus) and a control (without fungicide) were tested. The residual fungicide effects were evaluated by germination, accelerated ageing and seed sanitary tests. In accordance with the results, the treatments used to control soybean rust did not damage the seed physiological quality. The treatments Impact125SC + agefix and Impact Duo + Agefix certified seed free of *Cercospora kikuchii* fungi.

Keywords: *Glycine max*, germination, sanitary, chemical treatment.

4.2. INTRODUÇÃO

A utilização de sementes de qualidade é primordial para o sucesso da produção, pois é por meio destas que as tecnologias introduzidas pelo melhoramento genético e pelas ferramentas da biotecnologia são levadas até o agricultor.

Define-se qualidade de sementes como um conjunto de características que determinam seu valor para a semeadura, indicando que o potencial de desempenho das sementes somente pode ser identificado, de maneira consistente, quando é considerada a interação dos atributos de natureza genética, física, fisiológica e a sanitária (MARCOS FILHO, 2005).

As sementes de soja podem sofrer com ataque de um grande número de patógenos, destacando-se os fungos, que podem afetar seriamente tanto o rendimento quanto a qualidade da semente. Fungos como *Diaporthe phaseolorum*, *Colletotrichum dematium*, *Cercospora kikuchii* e *Phomopsis sojae* podem afetar plantas, vagens e sementes em vários estádios da lavoura. Na maioria dos casos, esses organismos são responsáveis pela redução da germinação das sementes, em anos que ocorrem períodos de alta umidade relativa ou chuvas entre a maturação e a colheita e, como conseqüência, tem-se a

produção de sementes de soja com reduzida qualidade fisiológica (ATHOW e LAVIOLETTE, 1973; COSTA et al., 2003).

Um importante patógeno que afeta as plantas no campo e por consequência, causa prejuízos ao rendimento de sementes é o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja. A disponibilidade limitada de cultivares resistentes faz com que o manejo da cultura, por meio de aplicação de agroquímicos, seja uma das alternativas mais usadas (YORINORI, 2002; GODOY e CANTERI, 2004; GODOY, 2007).

Os fungicidas são compostos químicos que possuem ação protetora, curativa e sistêmica (JULIATTI, 2010). Estudos mostram que, em condições severas de epidemia, são necessárias de três a cinco aplicações em intervalos de dez dias, o que poderia provocar um efeito residual desses produtos na planta, inclusive nas sementes (SINCLAIR e HARTMAN, 1995).

Apesar de haver recomendação oficial de fungicidas para controle das doenças fúngicas da parte aérea (oídio e ferrugem), faltam informações sobre o período residual dos produtos com relação às doenças de final de ciclo (KLINGELFUSS e YORINORI, 2001),

A ferrugem asiática é uma doença que está presente no campo durante praticamente todo o ciclo da planta e, portanto, o efeito residual dos fungicidas pode ser fitotóxico às plantas e permitir que resíduos permaneçam nas suas sementes, podendo causar prejuízos à qualidade fisiológica das mesmas (GODOY et al., 2007). Por outro lado, a aplicação de fungicidas foliares pode diminuir a incidência de fungos associados às sementes.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de aplicações de fungicidas utilizados no controle da ferrugem asiática da soja na qualidade sanitária e fisiológica de sementes.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Produção do material vegetal

A cultivar de soja utilizada foi a BRS 245 RR, sendo realizados todos os tratamentos culturais de acordo com as especificações da cultura. O experimento foi instalado na área experimental da Embrapa Soja situada na cidade de Londrina-PR, durante a estação e cultivo 2008/09. O delineamento utilizado foi de blocos completos casualizados sendo as parcelas constituídas por seis linhas de plantas espaçadas em 0,45 metros e com seis metros de comprimento.

Os produtos utilizados (Tabela 5) foram fungicidas de parte aérea aplicados no controle da ferrugem da soja aprovados na Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil (RPSRCB).

Utilizaram-se duas aplicações dos produtos, sendo a primeira no estágio fenológico R1 (início do florescimento), no dia 11 de fevereiro de 2009 e a segunda aplicação no estágio R5.1 (Início do enchimento das sementes), no dia 02 de março de 2009.

Os fungicidas foram aplicados com auxílio de pulverizador costal pressurizado com CO₂, equipado com barra de dois metros de largura, com

quatro bicos (Teejet XR 110:02), espaçados em 0,5 metros e calibrados para vazão de 200 L.ha⁻¹. As aplicações foram realizadas pelo período da manhã, com umidade relativa acima de 60% e temperatura abaixo de 30 °C.

A colheita foi realizada com colhedora de parcelas (Winter steiger modelo classic).

Tabela 5. Fungicidas químicos e respectivas doses, utilizados no controle da ferrugem da soja, cultivar BRS 245 RR. Londrina-PR, 2009.

Tratamento	Ingrediente ativo	Dose (L.ha⁻¹)
1 – Testemunha	-	-
2 - Priori Xtra + Nimbus (0,5% v/v)	Azoxistrobina + ciproconazole (Syngenta)	0,3
3 – Artea	Cyproconazole + propiconazole (syngenta)	0,3
4 – Virtue	Epoxiconazole (BASF)	0,4
5 - Impact 125 SC + agefix (1% v/v)	Flutriafol (Cheminova)	0,5
6 – Caramba	Metconazole (BASF)	0,6
7 – Opera + Assist (0,5 L.ha ⁻¹)	Piraclostrobina + epoxiconazole (BASF)	0,5
8 – Folicur	Tebuconazole (Bayer)	0,5
9 – Orius	Tebuconazole (Milenia)	0,4
10 - Domark 100 EC + Aqtem (0,5 L.ha ⁻¹)	Tetraconazole	0,5
11 – Eminent	Tetraconazole	0,4
12 – Tebucó NORTOX	Tebuconazole (Nortox)	0,5
13 - Impact Duo + Agefix (1% v/v)	Tiofanato metílico + flutriafol (Cheminova)	0,6
14 - Sphere + 250mL.ha ⁻¹ de óleo	Trifloxistrobina + ciproconazole (Bayer)	0,3
15 – Nativo + 500mL.ha ⁻¹ de Aureo	Trifloxistrobina + tebuconazole (Bayer)	0,5
16 - Approach Prima + Nimbus 0,5L.ha ⁻¹	Picoxistrobina + ciproconazole (Du Pont)	0,3

4.3.2. Avaliação da qualidade das sementes

A qualidade das sementes foi avaliada através dos testes de germinação, envelhecimento acelerado e método do papel-de-filtro.

4.5.2.1. Teste de germinação

As sementes foram colocadas para germinar em substrato rolo de papel umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Foram utilizadas três repetições de 200 sementes (25 sementes por rolo). As amostras foram incubadas em germinador com temperatura constante de 25°C. As avaliações foram realizadas aos sete e 14 dias após a semeadura, sendo avaliadas as porcentagem de plântulas normais, anormais e mortas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

4.4.2.2. Envelhecimento acelerado

Foram utilizadas 600 sementes de soja por tratamento, colocadas em caixas gerbox, sobre uma tela de aço inox, contendo 40 mL de água destilada. As sementes foram mantidas em câmara BOD a 42°C e 100% de umidade relativa (MARCOS FILHO, 1999). Após 48 horas, as sementes foram submetidas ao teste de germinação (substrato papel), utilizando-se três repetições de 200 sementes, sendo a avaliação realizada no quinto dia após a semeadura.

4.4.2.3. Método do papel-de-filtro

Realizado de acordo com metodologia descrita por Neergaard (1979), realizou-se previamente a desinfestação das caixas plásticas do tipo *gerbox*, em solução de hipoclorito. Posteriormente, as sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel-de-filtro, previamente umedecido com água esterilizada. Foram utilizadas três repetições de 200 sementes (20 sementes por *gerbox*). As amostras foram incubadas a temperatura de 20°C, por período de sete dias. A identificação dos fungos foi através de análise visual com auxílio de microscópio estereoscópio binocular com aumento de 60 vezes.

4.4.3. Análise Estatística

O delineamento estatístico utilizado foi de blocos completos casualizados com quatro repetições. Os dados de análise sanitária foram transformados por $\sqrt{x+0,5}$. Realizou-se a análise de variância e a comparação das médias pelo teste Scott-Knott, utilizando o programa SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade das sementes, pelo teste de germinação em papel, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja, nas condições experimentais de presença do fungo causador da ferrugem não houve efeito deste e nem da aplicação de fungicidas durante a produção, sobre a germinação de sementes (Tabela 6). Esta ocorrência pode ser atribuída ao fato de que o teste de germinação fornece condições favoráveis para que as sementes expressem a máxima capacidade germinativa.

Durante avaliação do teste de germinação, observaram-se anormalidades em algumas plântulas oriundas dos tratamentos em que foram aplicados fungicidas, entretanto a ocorrência destas plântulas anormais não causou diferença significativa entre tratamentos. Os sintomas que caracterizam fitotoxicidade são engrossamento, encurtamento e rigidez do hipocótilo (FRANÇA NETO et al., 2000).

Com relação aos dados do teste de envelhecimento acelerado, a testemunha apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos aonde houve aplicação de fungicidas. Pode-se atribuir este menor vigor das sementes devido a uma maior incidência de fungos no tratamento testemunha. O

teste de envelhecimento acelerado é um dos mais indicados para avaliar o vigor de sementes (MARCOS FILHO et al., 2000). Neste teste avalia-se a respostas das sementes por meio de teste de germinação, após elas terem sido submetidas à temperatura elevada e umidade relativa do ar próxima a 100% por determinado período de exposição (ROSSETTO e MARCOS FILHO, 1995).

Tabela 6. Germinação e envelhecimento acelerado em sementes de soja oriundas de plantas tratadas com diferentes fungicidas químicos aplicados para o controle da ferrugem da soja.

Tratamentos	Germinação (%)	E.A (%)
1 – Testemunha	79 a	70 b
2 - Piori Xtra + Nimbus (0,5% v/v)	80 a	76 a
3 – Artea	85 a	75 a
4 – Virtue	86 a	76 a
5 - Impact 125 SC + agefix (1% v/v)	85 a	85 a
6 – Caramba	83 a	83 a
7 - Opera + Assist (0,5 L.ha ⁻¹)	83 a	83 a
8 – Folicur	87 a	77 a
9 – Orius	88 a	78 a
10 - Domark 100 EC + Aqtem (0,5 L.ha ⁻¹)	86 a	76 a
11 – Eminent	84 a	76 a
12 - Tebuco NORTOX	82 a	76 a
13 - Impact Duo + Agefix (1% v/v)	82 a	78 a
14 - Sphere + 250mL.ha ⁻¹ de óleo	81 a	79 a
15 – Nativo + 500mL.ha ⁻¹ de Aureo	82 a	76 a
16 - Aproach Prima + Nimbus 0,5L.ha ⁻¹	83 a	80 a
CV	6,7	7,8

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

Nos resultados do teste de sanidade de sementes de soja, não houve diferença significativa entre os tratamentos apenas para o patógeno *Macrophomina phaseolina*. A transmissão deste patógeno via sementes, embora ocorra, não é importante, uma vez que o inóculo existe na maioria dos solos

(HENNING, 2005). Nas lavouras de soja este fungo causa a podridão negra das raízes, sendo uma doença que ocorre frequentemente e pode causar prejuízos em condições de clima seco e/ou presença de solo compactado.

Constatou-se diferença significativa para o fungo *Cercospora kikuchii*, causador da mancha-púrpura. Os tratamentos 5 e 13, foram os melhores, pois apresentaram 0% de incidência deste patógeno. Os produtos utilizados nestes tratamentos possuem como princípio ativo Flutriafol e Tiofanato metílico + flutriafol, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Gagliardi et al. (2009), aonde estes autores apontam o flutriafol como sendo o melhor produto para controle da *Cercospora kikuchii*.

Nas plantas de soja este fungo causa crestamento foliar e pode atacar vagens, hastes, pecíolos e folhas, acarretando redução da produtividade. Trabalhos conduzidos na Embrapa Soja demonstraram que apesar deste fungo ser bastante freqüente em sementes de soja, não há efeito do mesmo na qualidade de sementes (HENNING, 2005). No entanto cabe ressaltar que a presença deste patógeno pode prejudicar o aspecto visual do lote de sementes e conseqüentemente a sua comercialização.

Com relação a *Colletotrichum truncata*, o tratamento testemunha foi o que apresentou a maior incidência deste patógeno, diferindo significativamente dos demais. Os tratamentos aonde houve aplicações de fungicidas, conseguiram manter as sementes livres ou com baixa incidência do patógeno. Nas plantas de soja este patógeno causa antracnose e nas sementes pode causar deterioração, morte de plântulas e infecção sistêmica em plântulas adultas (HENNING, 2005).

Outro patógeno encontrado foi *Phomopsis* sp., causador da queima da haste e da vagem em plantas de soja e que pode causar redução na qualidade

das mesmas, especialmente quando ocorrem períodos chuvosos associados a elevadas temperaturas. O tratamento 5 e o tratamento 13 foram os mais eficazes, apresentando 0% de incidência deste patógeno.

Com relação ao fungo *Fusarium semitectum*, esse foi o fungo que apresentou maior ocorrência. Esse é um patógeno comum em sementes de soja, sendo considerado parasita fraco ou saprófita, foi incluído entre os fungos fitopatogênicos, por causar problemas na germinação em laboratório, assim como *Phomopsis* sp. (HENNING, 2005). Segundo este mesmo autor em condições de elevada incidência de *Fusarium semitectum*, deve-se proceder à germinação em areia, pois desta maneira elimina-se o tegumento da semente no substrato, pois como o patógeno fica aderido à superfície da semente, não prejudica assim o processo de germinação.

Tabela 7. Qualidade sanitária de sementes de soja com base no percentual de ocorrência oriundas de plantas tratadas com diferentes fungicidas químicos aplicados para o controle da ferrugem da soja.

Treatamento	<i>Cercospora kikuchii</i>	<i>Colletotricum dematium</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
1	5,83 a	2,00 a	2,33 a	3,33 a	0,00 a
2	1,83 b	0,00 b	0,17 b	1,33 b	0,00 a
3	2,33 b	0,00 b	0,33 b	0,33 b	0,00 a
4	0,83 b	0,00 b	0,33 b	0,33 b	0,33 a
5	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,50 b	0,00 a
6	5,33 a	0,00 b	1,67 a	3,17 a	0,00 a
7	4,50 a	0,00 b	1,00 a	2,67 a	0,17 a
8	4,50 a	0,00 b	2,00 a	3,00 a	0,00 a
9	2,33 b	0,00 b	0,37 b	1,33 b	0,00 a
10	0,83 b	0,00 b	0,33 b	2,00 b	0,00 a
11	0,50 b	0,00 b	0,33 b	1,67 b	0,00 a
12	3,16 a	0,00 b	0,22 b	3,00 a	0,00 a
13	0,00 c	0,00 b	0,00 b	3,83 a	0,00 a
14	5,33 a	0,16 b	0,50 b	4,50 a	0,00 a
15	6,00 a	0,00 b	0,50 b	4,50 a	0,17 a
16	4,33 a	0,16 b	0,17 b	3,50 a	0,33 a
CV	36,7	26,7	17,8	25,2	24,3

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

4.6. CONCLUSÕES

Os tratamentos utilizados para o controle da ferrugem asiática da soja não prejudicam a qualidade fisiológica das sementes.

A aplicação dos fungicidas Impact125SC+agefix e Impact Duo+Agefix, nos estádios fenológicos R1 e R5.1 resulta em sementes livres de *Cercospora kikuchii* e de *Phomopsis* sp.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho reúnem e confirmam informações oriundas de experimentos prévios, os quais utilizaram diferentes cultivares de soja, com variações nos mecanismos de resistência, reforçando principalmente o potencial dos genes *Rpp4* e *WRKY*, como envolvidos em mecanismos de resposta à resistência a ferrugem asiática da soja.

Os programas de melhoramento poderão se valer dessas informações para auxiliar no desenvolvimento de genótipos resistentes para esse caráter. Entretanto, a grande variabilidade do patógeno, a elevada patogenicidade das diferentes raças e o curto período de reprodução do patógeno levam a uma elevada pressão de seleção em relação ao hospedeiro, o que dificulta a obtenção de genótipos resistentes.

Com relação ao efeito de fungicidas utilizados no controle da doença, na qualidade de sementes, quando o controle químico é efetuado na dose e na época recomendada, com monitoramento constante, não há prejuízos à qualidade de sementes em função do residual dos produtos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

ANDRADE, P. J.M.; ANDRADE, D. M. A. A. Ferrugem asiática: uma ameaça a sojaicultura brasileira. **Circular Técnica**. Dourados, MS, 2006.

ARIAS, C.A.A., RIBEIRO, A.S., YORINORI, J.T., BROGIN, R.L., OLIVEIRA, M.F. & TOLEDO, J.F.F. Inheritance of resistance of soybean to rust (*Phakospora pachyrhizi* Sidow). In: VII WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Embrapa, 2004, p.100.

ATHOW, H.L.; LAVIOLETTE, F.A. Pod protection effect on soybean seed germination and infection with *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and other microorganisms. **Phytopathology**, v.63, n.8, p.1021-3, 1973.

BACHEM, C.W.; VAN DER HOEVEN, R.S.; de BRUJIN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABAEU M, VISSER R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, v.9, n.5, p.745-753, 1996.

BEIDLER, J.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L.; Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver nitrate. **Anal. Biochem.**, v.126, n.2, p.374-380, 1982.

BONATO, E.R., BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina : EMBRAPA- CNPSo, 1987. 61p. (Documentos, 21.)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BRYAN, G.T.; WU, K.S.; FARRALL, L.; JIA, Y.; HERSHEY, H.P.; MCADAMS, S.A.; FAULK, K.N.; DONALDSON, G.K.; TARCHINI, R.; VALENT, B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell**, v.12, p.2033-2046, 2000.

BROGIN, R.L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à septoriose em soja**. 2005. 106p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, Série Agronômica, 2005.

CONAB. Safras: comparativo da área, produção e produtividade. Acessado em maio de 2010. On-line. Disponível na Internet: <http://www.conab.gov.br>

CONSÓRCI ANTIFERRUGEM. **Sistema de alerta (2005)**. Acessado em Junho de 2010. On-line. Disponível na Internet: <http://www.consorcioantiferrugem.net/>

CONSÓRCI ANTIFERRUGEM. **Palestras (2008)**. Acessado em Junho de 2010. On-line. Disponível na Internet: <http://www.consorcioantiferrugem.net/>

CONSÓRCI ANTIFERRUGEM. **Tabela de custo (2010)**. Acessado em Junho de 2010. On-line. Disponível na Internet: <http://www.consorcioantiferrugem.net/>

COSTA, N.P.; MESQUITA, C.M.; MAURINA, A.C.; FRANÇA NETO, J.B.; KRYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Qualidade fisiológica, física e sanitária de sementes de soja produzidas no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina/PR, v.25, n.1, p.128-132, 2003.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, n.4, p.299–306, 2001.

DALLAGNOL, L. et al. Utilização e Acibenzolar-S-Methyl para o controle de doenças foliares da soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.3, p.255-259, 2006.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.C.; CAMPBELL, A.P. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generation differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n.12, p.6025-6030, 1996.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja**: região Central do Brasil, 2003. Londrina, 2004. 239p.

EULGEM, T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. **Trends Plant Science**. v.10, p.71-78, 2005.

EXNER, V.; GRUISSEM, W.; HENNIG, L. Control of trichome branching by Chromatin Assembly Factor-1. **BMC Plant Biology**. v.8, 54, 2008

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1981. 12p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).

FLOR, H.H. The complementary genetic systems in flax and flax rust. **Advances Genetics**, San Diego, v.8, n.1, p.29-54, 1956.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T. **Caracterização dos problemas de fitotoxicidade de plântulas de soja devido ao tratamento de sementes com fungicida Rhodiauram 500 SC, na safra 2000/01**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 24p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 27).

GAGLIARDI, B.; CARVALHO, T.C.; PUPIM, T.L.; GOMES JUNIOR, F.G.; TIMÓTEO, T.S.; KOBORIS, N.M.; MORAES, M.L.D.; MENTEM, J.O.M. Efeito de fungicidas para controle da ferrugem asiática na qualidade de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v.31, n.4, p.120-125, 2009.

GANESH, D.; PETITOT, A.-S.; SILVA, M.C. *et al.* Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, v.170, p.1045-1051, 2006.

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R. A.S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.117, p.545-553, 2008.

GODOY, C.V.; CANTERI, M.G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, v.29, n.1, p.97-101, 2004.

GODOY, C.V.; PIMENTA, C.B.; WRUCK, D.S.M. **Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/07. Resultados sumarizados dos ensaios em rede**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 42).

HABU, Y.; FUKUDA-TANAKA, S.; HISATOMI, Y.; IIDA. Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-pb sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** n.234, p.516-521, 1997.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean Rust Research: Progress and Future Prospects. In WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 5., Bangkok, 1997. **Proceedings**. Chiang Mai: Kasetsart University Press, 1997. p.180-186.

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

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

HENNIG, L.; BOUVERET, R.; GRUISSEM, W. MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. **Trends Cell. Biol.**, v.15, p.295–302, 2005.

HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52p. (Embrapa Soja.Documentos, 264).

JONES, D.A.; JONES, J.D.G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. **Adv. Bot. Res**, v.24, p.89-167, 1997.

JULIATTI, F.C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos**. Disponível em:<<http://ppi-ppic-ipi.org/ppiweb/pbrazil.nsf>>. Acesso em: 18/05/2010.

KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, 158-164, 2001.

KOBE, B. & DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **TIBS**, v.19, p.425-430, 1994.

LANGE, C.E. Soja. In: Barbieri, R.L. STUMPF, E.R.T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 909p.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n.5072, p.967-971, 1992.

MADSEN, L.H.; COLLINS, N.C.; RAKWALSKA, M.; BACKES, G.; SANDAL, N.; KRUSELL, L.; JENSEN, J.; WATERMAN, E.H.; JAHOR, A.; AYLIFFE, M.; PRYOR, A.J.; LANGRIDGE, P.; SCHULZE-LEFERT, P.; STOUGAARD, J. Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. **Molecular Genetics and Genomics**, v.269, p.150-161, 2003.

MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; WU, P. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p.137-143, 2004.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p.3.1-3.24.

MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A.D.C.; CHAMMA, H.M.C.P. Tamanho da semente e o teste de envelhecimento acelerado para soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba/SP, v. 57, n. 3, p. 473-482, 2000.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

McLEAN, R.J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.31, p.951-956, 1980.

MEDEIROS, J.E. **Seleção de bactérias para controle da meloidoginose e atividade isoenzimática de meloeiro parasitado por *Meloidogyne incógnita***. 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Recife, Recife, 2007.

MEDEIROS, A.G. **Parâmetros genéticos e potencial agrônômico de cruzamentos tipo adaptado x exótico em soja, com ênfase na reação à ferrugem asiática**. 2009. 158p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MELCHING, J.S.; DOWLER, W.M.; KOOGLER, D.L.; ROYER, M.H. Effects of duration, frequency and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant Disease**, v.73, p.117-122, 1989.

MEYER, J.D.; SILVA, D.C.; YANG, C.; PEDLEY, K.F.; ZHANG, C.; VAN DE MORTEL, M.; HILL, J.H.; SHOEMAKER, R.C.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A.; GRAHAM, M.A. Identification and analyses of candidate genes for rpp4-mediated resistance to asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**, v.150, n.1, p.295-307, 2009.

MUSSURY, R.M.; BETONI, R.; SILVA, A.M.; DECIAN, V.; SCALON, S.P.Q.; BARBOSA, E.L. Morfoanatomia de *Glycine max* (L.) Merrill infectadas por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 459-461, 2007.

NASS, L.L.; MIRANDA FILHO, J.B.; SANTOS, M.X. Uso de germoplasma exótico no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARESINGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 5, p. 101-122.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. 2. ed. London, MacMillan Press, v.2, 1979.

OGLE, H.J.; BYTH, D.E.; McLEAN, R.J. Effect of rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on soybean yield and quality in south-eastern Queensland. Aust. **Journal of Agricultural Research**, v.30, p.883-893, 1979.

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

PARLEVLIET, J.E. Presents concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p.7-15, 1997. Suplemento.

QUICK, W.P.; SCHEIBE, R.; NEUHAUS, H.E. Induction of hexose-phosphate translocator activity in spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, v.109, p.113–121. 1995.

RAIRDAN, G.J.; COLLIER, S.M.; SACCO, M.A.; BALDWIN, T.T.; BOETTRICH, T.; MOFFETT, P. The coiledcoil and nucleotide binding domains of the potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling. **Plant Cell**, v.20, p.739-751, 2008.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R. Ferrugem da soja: revisão e aspectos técnicos. In: REIS, E. M. (Ed.). **Doenças na cultura da soja**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2004. p. 55-70.

ROSSETTO, C.A.V.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre os métodos de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Scientia Agricola**, v.52, p.123, 1995.

ROSSI, M. GOGGIN, F.L., MILLIGAN, S.B., KALOSHIAN, I., ULLMAN, D.E.; WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v.95, p.9750-9754, 1998.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. I.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.; **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2001.

SANTOS, J.A; JULIATTI, F.C.; SANTOS, V.A.; POLIZEL, A.C.; JULIATTI, F.C; HAMAWAKI, O.T. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n. 3, p.443-447, 2007.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, n.5235, p.467-470, 1995.

SILVA, E.A.A., VON PINHO, E.V.R., VIEIRA, M.G.G.C.; CARVALHO, M.L.M. & MACHADO, J.C. Alterações dos padrões de enzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.1725-1732, 2000.

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, 1995. p.6-10

SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Soybean Rust Workshop**. Urbana, 1996. **Proceedings**. Urbana: National Soybean Research Laboratory, 1996.

SOUZA, P.I.M.; TOLEDO, J.F.F.; MOREIRA, C.T.; et al. BRSGO 7560: Primeira cultivar de soja resistente à ferrugem asiática indicada pela embrapa e parceiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 5., 2009; MERCOSOJA, 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2009. Seção Trabalhos, t. 426. 1 CD-ROM.

SPINOLA, M. C. M.; CICERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n.2, p.263-270, 2000.

TAMELING, WIL.; ELZINGA, S.D.J.; DARMIN, P.S.; VOSSSEN, J.H.; TAKKEN, F.L.W.; HARING, M.A.; CORNELISSEN, B.J.C. The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. **Plant Cell**, v.14, p.2929-2039, 2002.

TIAN, D.; TRAW, M.B.; CHEN, J.Q.; KREITMAN, M.; BERGELSON, J. Fitness costs of R-gene mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.423, p.74-77, 2003.

TSCHANZ, A.T.; SHANMUGASUNDARAM, S. Soybean rust. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., Boulden, 1984. **Proceedings**. Boulden: Westview Press, 1984. p.562-567.

VAN DE MORTEL, M.; RECKNOR, J.C.; GRAHAM, M.A.; NETTLETON, D.; DITTMAN, J.D.; NELSON, R.T.; GODOY, C.V.; ABDELNOOR, R.V.; ALMEIDA A.M.R.; BAUM, T.J. Distinct biphasic mRNA changes in response to asian soybean rust infection. **Mol Plant-Microbe Interact**, v.20, p.887-899, 2007.

VELCULESCU, F.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n.5235, p.484-487, 1995.

VENTIMIGLIA, L.A.; et al. Potencial de rendimento da soja em razão da disponibilidade de fósforo no solo e dos espaçamentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.195-199, 1999.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p.4407-4414, 1995.

WEBER H, BORISJUK L, WOBUS U. Molecular physiology of legume seed development. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.253–279, 2005.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic Races of *Phakopsora pachyrhizi* on Soybean and Wild Host Plants Collected in Japan. **Journal of Genetics and Plant Pathology**, Japan, v.68, n.1, p.52-56, 2002.

YORINORI, J.T. **Doenças da soja no Brasil**. In: FUNDAÇÃO CARGILL. Soja no Brasil Central. Campinas: Fundação Cargill, p.301-363, 1986.

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. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. (Folder).

YORINORI, J. T. Ferrugem da soja: panorama geral. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., / INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., / CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 3., Foz do Iguaçu, 2004. **Proceedings**. Londrina: Embrapa Soybean, 2004.

YORINORI, J.T.; JUNIOR, J.N.; LAZZAROTO, J.J. **Ferrugem “asiática” da soja no Brasil**: evolução, importância econômica e controle. Londrina: EMBRAPA Soja, 2004. 36 p. (EMBRAPA Soja. Documentos, 247).

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application**, publication 0534858 A1, bulletin 93/13, 1993.

ZHANG, Y.; WANG, L. The WRKY transcription factor superfamily its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC Evolutionary Biology**, v.5, n.1, 2005.

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](#)