UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALINE BORGES

Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível *Phaseolus vulgaris*/*Colletotrichum lindemuthianum*

Piracicaba
2011

ALINE BORGES

Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível *Phaseolus vulgaris*/*Colletotrichum lindemuthianum*

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Dra. Danielle Gregorio Gomes Caldas

PIRACICABA

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Borges, Aline
Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível *Phaseolus vulgaris*/*Colletotrichum lindemuthianum* / Aline Borges; orientadora Danielle Gregorio Gomes Caldas. - - Piracicaba, 2011.
117 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Antracnose 2. Expressão gênica 3. Feijão 4. Interação planta-patógeno 5. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 575.111:633.35

Dedico este trabalho aos meus pais (Haideé e Luiz) e aos meus irmãos (Luiz, Max e Gladys), que têm sido sempre o apoio necessário em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

À Dra. Danielle G.G. Caldas pela orientação, profissionalismo e amizade, o que permitiu a realização deste trabalho, e que me acrescentou muito como pessoa e profissional.

À Profa. Dra. Siu M. Tsai também pela orientação e ainda por todas as oportunidades e conselhos essenciais à minha formação pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP pelas oportunidades concedidas durante este mestrado.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de mestrado.

A Prof. Dra. Maeli Melotto (University of Texas at Arlington, EUA) pela idealização de grande parte do projeto e sugestões importantes para condução do estudo.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, por ceder as sementes de SEL 1308, possibilitando o início do trabalho.

À Dra. Adriane Wendland da EMBRAPA arroz e feijão (Goiânia – GO) pelo envio do fungo da raça 73 de *C. lidemuthianum*, necessária para o andamento do trabalho.

Ao pessoal do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do IAC (Campinas – SP) pelo cultivo e preparação dos inóculos do fungo utilizado no estudo.

Ao pessoal do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Grãos e Fibras do IAC (Campinas – SP) pela realização do experimento de verificação da raça do patógeno.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Celular e Molecular: Fábio, Elias, Wagner e Chiquinho, pelo apoio inestimável nos trabalhos de laboratório e campo.

À sempre alegre Ludmila pela prontidão em ajuda sempre que necessário; pela grande amizade e os constantes momentos de desconcentração, essenciais na vida.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, carinho, apoio, e ainda pelos ensinamentos sobre moral e respeito, os quais contribuem para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu cunhado Jeffrey Sharp pela amizade e prontidão em corrigir meus textos e artigos em inglês.

Aos meus tios, João e Vanda pelo apoio incondicional e acreditar nas minhas escolhas.

Aos amigos do laboratório, Beatriz, Maria Júlia, Milena, Mariana Germano, Fabiana, Lucas, Mariana Redondo, Lina, Acacio, Clóvis e outros que fazem parte deste laboratório, os quais me acolheu e têm permitido trocas de idéias e momentos de descontração.

Em especial, aos queridos amigos Viviane (Loly), Gustavo (Gravador), Larissa (Spu), Micheline, Éneas e Ana Beraldo pela ajuda em diversos aspectos do trabalho; troca de experiências e momentos de descontração.

Às minhas amigas de casa, Fernanda (Tripz) e Berenice pelas boas conversas e pelos momentos divertidos.

A Deus por iluminar minhas decisões e me guiar pelos caminhos mais adequados.

RESUMO

BORGES, A. **Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível** *Phaseolus vulgaris*/*Colletotrichum lindemuthianum*. 2011. 117 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011.

A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) se destaca como fonte protéica e mineral para as populações humanas, principalmente, para populações de baixa renda. Dentre os agentes patogênicos, o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. – Scrib., causador da antracnose, é considerado o de maior importância devido aos seus efeitos destrutivos para o feijoeiro. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes candidatos a atuarem na defesa da planta durante a interação incompatível do feijoeiro SEL 1308 e raça 73 do *C. lindemuthianum*, considerando diferentes tecidos (folhas, epicótilo e hipocótilo) e períodos de interação (24, 48, 72 e 96 horas). Além disso, o trabalho visou a validação de bibliotecas de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de feijoeiro (MELOTTO et al., 2005) e a análise da estabilidade de possíveis genes de referência para as análises de expressão por RT-qPCR. Foram utilizados 20 genes no estudo: 12 possivelmente responsivos ao patógeno e oito candidatos a genes de referência. A eficiência média das curvas de amplificação e valores dos ciclos e de quantificação (Cq) foram definidos no programa LinRegPCR. A estabilidade dos genes de referência foi avaliada nos programas geNorm e NormFinder. A expressão relativa dos genes alvos e normalizadores e as análises estatísticas foram determinadas no programa REST. As combinações de genes de referência *Act2*/*Ukn2* e *InsDeg*/*Act2* foram utilizadas para normalização dos genes-alvo por RT-qPCR. Os dados de expressão relativa dos transcritos entre as bibliotecas de ESTs foram validados pelo RT-qPCR. Os genes-alvo analisados foram todos responsivos ao sistema fitopatogênico avaliado, revelando perfil transcricional específico nos tecidos e período de interação com o patógeno. Os dados permitiram a disponibilização de genes de referência importantes para análise de expressão por RT-qPCR em feijoeiro sob estresse biótico; e indícios para melhor entendimento dos processos envolvidos nos mecanismos de defesa do feijoeiro ao patógeno da antracnose.

Palavras-chave: Feijoeiro comum. Antracnose. Interação incompatível. Bibliotecas de ESTs. Quantificação relativa. RT-qPCR.

ABSTRACT

BORGES, A. **Expression analysis of genes related to incompatible interaction** *Phaseolus vulgaris*/*Coletotrichum*. 2011. 117 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011.

Common bean crop (*Phaseolus vulgaris* L.) highlight as protein and mineral source to the human population, especially, for low-income populations. Among the pathogens, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. - Scrib., which causes anthracnose, is considered the most important due to its destructive effects to common bean. This study aimed to evaluate the expression of candidate genes to act in defense of the plant during the incompatible interaction between common bean SEL 1308 and race 73 of *C. lindemuthianum*, considering different tissues (leaves, epicotyl and hypocotyl) and periods of interaction (24, 48, 72 and 96 hours). Also, this study attempted the validation of ESTs (Expressed Sequence Tags) libraries of common bean (MELOTTO et al., 2005) and the evaluation of candidate reference genes stability for expression analysis in RT-qPCR. Twenty genes were used: 12 candidate genes responsive to the pathogen and eight candidate reference genes. The average efficiency of amplification curves and the values of quantification cycles (Cq) were defined in LinRegPCR software. The stability of reference genes was evaluated using geNorm and NormFinder softwares. Relative expression of target and normalizer genes and statistical analysis were determined by REST software. The *Act2/Ukn2* and *InsDeg/Act2* reference genes combinations were used for normalization of target genes by RT-qPCR. The data of relative expression of transcripts between the libraries of ESTs were validated by RT-qPCR. All target genes analyzed were responsive to the pathogenic system evaluated, revealing specific transcriptional profiles in tissues and periods of interaction with the pathogen. The data provided the availability of normalizers important for expression analysis by RTqPCR in beans under biotic stress; and evidences to understand the processes involved in defense mechanisms of common bean against the anthracnose pathogen.

Keywords: Common bean. Anthracnose. Incompatible interaction. ESTs libraries. Relative quantification. RT-qPCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 Importância econômica da cultura do feijoeiro comum 15
2.2 O *Colletotrichum lindemuthianum* e a doença antracnose na cultura do feijoeiro 16
2.3 Controle genético da doença antracnose no feijoeiro 18
2.4 Interação de incompatibilidade hospedeiro-patógeno 19
2.5 *Expressed sequence tags* de *P. vulgaris* 24
2.6 A técnica RT-qPCR para estudos moleculares e genes de referência 25
REFERÊNCIAS 28

3 GENES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE RT-qPCR EM FEIJOEIRO COMUM EM INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL COM O PATÓGENO DA ANTRACNOSE 35
RESUMO 35
ABSTRACT 36
3.1 Introdução 37
3.2 Material e métodos 38
3.2.1 Material Biológico 39
3.2.1.1 Material Vegetal 39
3.2.1.2 Preparo do inóculo do patógeno e inoculação das plântulas 39
3.2.2 Coleta do material vegetal 41
3.2.3 Seleção dos genes candidatos e desenho dos *primers* 42
3.2.4 Extração do RNA total 43
3.2.5 Curva de amplificação 44
3.2.6 Análises dos dados 44
3.2.7 Validação dos genes de referência 48
3.3 Resultados e discussão 48
3.3.1 Qualidade e quantificação de RNA total 48
3.3.2 *Primer*s para RT-qPCR: especificidade e eficiência da reação de amplificação 50
3.3.3 Estabilidade de expressão relativa do gene de referência 54

3.3.3.1 Genes de referência pelo programa geNorm 54
3.3.3.2 Genes de referências pelo programa NormFinder 58
3.3.4 Expressão relativa do gene *PvPR2* 60
3.4 Conclusões 62
REFERÊNCIAS.....63

4. VALIDAÇÃO DE BIBLIOTECAS DE ESTs OBTIDAS DE INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL O FEIJOEIRO COMUM E *C. lindemuthianum* 67
RESUMO.....68
ABSTRACT.....68
4.1 Introdução 69
4.2 Material e métodos.....70
4.2.1 Material Biológico 70
4.2.1.1 Material Vegetal.....70
4.2.1.2 Preparo do inóculo do patógeno e inoculação das plântulas.....71
4.2.2 Coleta do material vegetal 71
4.2.3 Seleção dos gene-alvo para as análises de RT-qPCR 72
4.2.4 Desenho dos *primers*.....73
4.2.5 Extração do RNA total.....73
4.2.6 Curva de amplificação 74
4.2.7 Análise dos dados 74
4.2.8 Análise dos genes de referência e genes-alvo.....75
4.3 Resultados e discussão.....76
4.3.1 Especificadade dos *Primer*s para RT-QPCR 76
4.3.2 Genes de referência e validação das bibliotecas de ESTs.....78
4.4 Conclusão.....81
REFERÊNCIAS.....82

5 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE FEIJOEIRO COMUM DURANTE INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL COM O PATÓGENO DA ANTRACNOSE 85
RESUMO.....85
ABSTRACT.....86
5.1 Introdução 87
5.2 Material e métodos.....89

5.2.1 Material vegetal 89
5.2.2 Inoculação das plântulas de SEL 1308 90
5.2.3 Coleta do material vegetal 90
5.2.4 Genes relacionados à defesa em feijoeiro comum e desenho de *primers* 90
5.2.5 Extração do RNA total 92
5.2.6 RT-PCR quantitativo 92
5.2.7 Análise dos dados 93
5.3 Resultados e discussão 94
5.3.1 Especificidade e eficiência dos *primers* 94
5.3.2 Expressão diferencial dos genes relacionados à interação incompatível SEL 1308 e *C. lindemuthianum* 96
5.3.2.1 Genes relacionados às proteínas PR 97
5.3.2.2 Genes relacionados às proteínas inibidoras de poligacturonase 101
5.3.2.3 Gene relacionado à enzima fenilalanina amônia liase 102
5.3.2.4 Gene relacionado às proteínas quinases 103
5.3.2.5 Gene relacionado às proteínas profilinas 104
5.3.2.6 Gene relacionado às proteína reprimidas por ultravioleta-B 105
5.3.2.7 Gene relacionado com o canal de íons mediados por nucleotídeos cíclicos 105
5.4 Conclusões 106
REFERÊNCIAS 107
ANEXO 113

1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui uma importante fonte nutricional e de proteínas para consumo humano, a qual pode complementar fontes ricas em carboidratos tais como arroz, milho e mandioca. Esta espécie é caracteriza por coevolução com o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. – Scrib.. Os cultivares de feijoeiro sucetíveis estabelecem interação de compatibilidade com este patógeno fúngico, o que permite o desenvolvimento da doença da antracnose, que afeta fortemente a produção e a produtividade agrícola do feijoeiro (MELOTTO; BALARDIN; KELLY, 2000). Com isto, a resistência genética é uma importante forma de controle da doença. Assim, o conhecimento das vias moleculares envolvidas no processo de resistência pode viabilizar a transferência de genes importantes para os cultivares suscetíveis.

A técnica de PCR em tempo real, baseada na amplificação de moléculas de DNA/cDNA e detecção de fluorescência com a utilização de fluoróforo, é uma eficiente ferramenta de quantificação molecular devido à sua rapidez de execução e sensibilidade na detecção de pequenas quantidades de produto. Devido a estas características, este método tem sido muito utilizado em diversas áreas da ciência, tais como microbiologia, estudos forenses e medicina (BUSTIN, 2002).

As bibliotecas de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) têm se destacado como importante fonte de recursos genômicos (GEPTS et al., 2008). Para o feijoiro, podem ser destcadas as bibliotecas de ESTs obtidas a partir da interação incompatível entre o feijoeiro e *C. lindemuthianum* (MELOTTO et al.; 2005). Destas bibliotecas, foram selecionados 12 genes relacionados a eventos de patogenicidade e utilizados para análise de quantificação relativa no feijoeiro SEL 1308 em interação de incompatibilidade com a raça 73 de *C. lindemuthianum*. Além disso, para normalização dos dados de RTq-PCR foram selecionados genes de referências ideais para as condições avaliadas; e a análise da expressão de oito genes das bibliotecas de ESTs foi realizada visando a validação dos resultados observados para os níveis de transcritos entre as bibliotecas de ESTs inoculadas e não inoculadas desenvolvidas por Melotto et al. (2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Importância econômica da cultura do feijoeiro comum

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae), é uma espécie diplóide 2n=22 (MOK; MOK, 1976), de origem americana e a principal dentre as cinco espécies cultivadas (*P.vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman) do gênero *Phaseolus* (BROUGHTON et al., 2003). Esta cultura tem grande importância para nutrição humana, principalmente para as populações de baixa renda, servindo de fonte proteica e mineral e complementando fontes ricas em carboidratos tais como arroz, milho e mandioca. Devido a isto, nas últimas décadas o feijão tem passado de uma cultura restritamente de subsistência para uma prática agrícola envolvida por tecnologias avançadas, englobando irrigação, uso balanceado de insumos, colheita mecanizada, dentre outras atividades (VIEIRA et al., 2005; GEPTS et al., 2008).

Em 2009, a produção mundial de feijão comum registrou valores em torno de 19 milhões de toneladas, sendo o Brasil o maior produtor atingindo valores em torno de 3,5 milhões de toneladas, seguido pela Índia (2,5 milhões de toneladas), China (1,5 milhões de toneladas), Estados Unidos (1,2 milhões de toneladas) e México (1,1 milhões de toneladas) (FAO, 2009). Em países desenvolvidos, tal como os EUA, e países da Ásia, tal como a China, grande parte da produção deste grão tem sido voltada ao mercado externo. Por outro lado, na maior parte dos países em desenvolvimento, assim como o Brasil e México, a produção tem sido predominantemente destinada ao mercado interno. Por exemplo, o mercado interno brasileiro absorve mais de 90% da produção dos grãos de feijoeiro, enquanto que os países desenvolvidos exportam mais de 30% de sua produção (GEPTS et al., 2008). Estes dados demonstram a importância desta cultura na dieta das populações de países em desenvolvimento.

Com base em levantamentos estatísticos nacionais, a produção nacional de feijão teve um pequeno decréscimo no ano de 2010 em relação ao levantamento do ano de 2009, devido, principalmente, a problemas climáticos. Com isto foi registrado para a cultura, produção em torno de 3,2 milhões de toneladas com produtividade de 924 kg/ha. Três regiões brasileiras devem se destacam na produção do feijão comum: a região Sul, como

principal produtora compreendendo 29,8% da produção brasileira, sendo 24,3% pertencente ao Estado do Paraná; a região Sudeste com registro de 29,1% da produção total; e por fim, a região Nordeste com produção de 20,1% da produção nacional (IBGE, 2010).

2.2 O *Colletotrichum lindemuthianum* e a doença antracnose na cultura do feijoeiro

O fungo da espécie *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. – Scrib. pertence a um amplo gênero dentro do filo Ascomycota (BAILER; JEGER, 1992). Este patógeno se caracteriza por apresentar duas fases distintas de nutrição (biotrófica e necrotófica), sendo assim denominado de hemibiotrófico. A nutrição por biotrofia tem como base a obtenção dos nutrientes através das células vivas do hospedeiro, enquanto que na necrotrofia o patógeno se nutre a partir das células mortas durante a ocorrência da doença (THROWER, 1966).

As etapas de colonização do fungo *C. lindemuthianum*, descritas por O'Connell; Bailey; Richmond (1985), permitem o desenvolvimento da doença da antracnose no feijoeiro comum suscetível (Figura 2.1).

A infecção do *C. lindemuthianum* tem o início na adesão da parede celular da planta e expansão do tubo germinativo, que se diferencia em um apressório melanizado. Este é tido como uma estrutura de forte aderência e que permite a perfuração da cutícula e da parede celular do hospedeiro. Posteriormente, pode ser observada a fase biotrófica com a formação da hifa de penetração (Figura 2.1 PE), que na região intracelular se dilata para formar uma vesícula (Figura 2.1 V), de onde se expandem hifas primárias (Figura 2.1 PH), que são circundadas pela membrana plasmática vegetal. Durante a fase biotrófica do fungo, o protoplasma da planta se mantém vivo e separado do protoplasma do patógeno por uma matriz interfacial. Em tono de 48 horas após a penetração do fungo inicia a desintegração da membrana plasmática. No entanto as hifas primárias podem continuar a se dispersar pelas células adjacentes (Figura 2.1 3) para formar hifas secundárias que não são mais cercadas pelas membranas do hospedeiro. Como resultado, ocorre o colapso da parede celular vegetal devido à secreção de grande quantidade de enzimas degradantes pelas hifas secundárias, tendo como consequência a morte das células hospedeiras, se

caracterizando assim a fase necrotrófica do fungo (MENDGEN; HAHN, 2002; O'CONNELL et al., 2000).

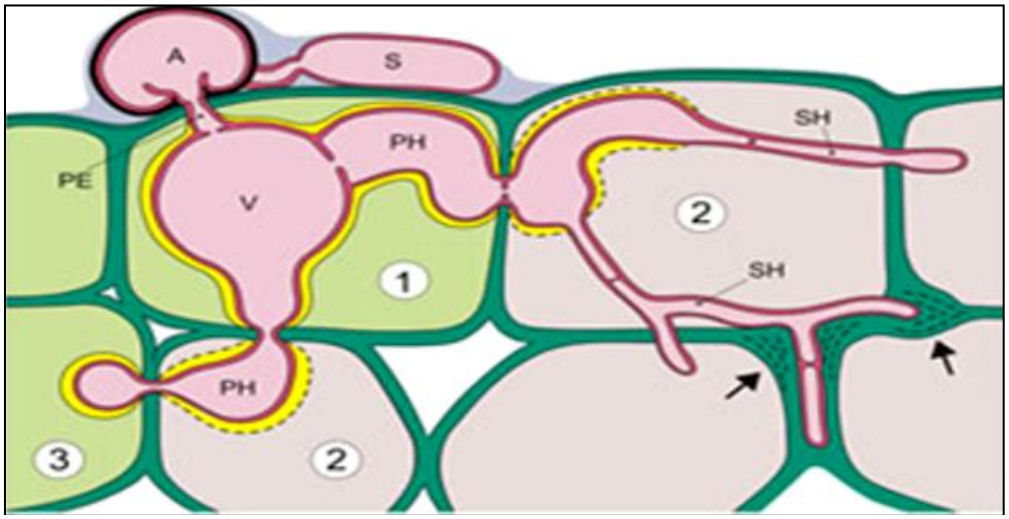


Figura 2.1 - Esquema da interação compatível entre feijoeiro comum e fungo hemibiotrófico *C. lindemuthianum*. Tubo germinativo (S); apressório melanizado (A); hifa de penetração (PE); vesícula (V); hifas primárias (PH); estágio biotrófico (1) matriz interfacial entre os protoplasmas do fungo e do hospedeiro (amarelo); fase de desintegração da membrana plasmática (2); novas células hospedeiras colonizadas pelas hifas primárias (3); hifas secundárias (SH); enzimas degradoras de parede celular (setas) (Modificado de Mendgen; Hahn, 2002)

A doença da antracnose tem grande importância para o cultivo do feijoeiro, devido à sua alta capacidade destrutiva sobre os cultivares suscetíveis, podendo resultar em perda total da produção em condições ambientais favoráveis ao patógeno (PASTOR-CORRALES; TU, 1989). Em adição, o fungo patogênico, que teria coevoluído com o feijoeiro comum, possui grande diversidade e muitas raças identificadas (MELOTTO; BALARDIN; KELLY, 2000; PASTOR-CORRALES et al. 1995).

A ocorrência frequente da doença pode ser observada em locais frios e elevados no Leste da África, Europa e América Latina (GRAHAN; RANALLI, 1997). No Brasil, a sua distribuição ampla pode afetar significativamente a produção nacional do feijão comum, especialmente nas Regiões Sul e Sudeste, onde predominam áreas serranas com temperaturas entre 17ºC a 22ºC, as quais favorecem o desenvolvimento do microrganismo. Dentre as diversas raças do patógeno, em território brasileiro se destacam as raças 65, 81 e 73 (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; ANDRADE; COSTA; RAVA, 1999; SILVA, 2004).

Os sintomas da antracnose se manifestam em todas as partes aéreas da planta, mas raramente nas raízes. As lesões podem aparecer no hipocótilo, no caule, nas folhas e mais comumente em vagens e sementes (KIMATI, 1980). A semente como fonte de infecção

resulta em sintomas primários nas folhas cotiledonares ou nos cotilédones, como lesões necróticas. A transmissão do patógeno se faz com facilidade, principalmente por sementes e restos vegetais, o que têm dificultado o controle da doença (SUTTON, 1992; TU, 1992).

2.3 Controle genético da doença antracnose no feijoeiro

O controle da antracnose no feijoeiro comum pode ser realizado por ação química, entretanto este método tem sido considerado significativamente oneroso. Assim, o emprego de técnicas para obter cultivares resistentes à antracnose tem sido uma estratégia eficiente e econômica para o controle da doença (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; PASTOR-CORRALES et al., 1995; SCHWARTZ; PASTOR-CORRALES; SINGH, 1982). Apesar da importância do controle genético, a ampla variabilidade e potencial para surgimento de novas raças virulentas dificultam a manutenção da resistência dos genótipos cultivados (MAHUKU et al., 2002). Portanto, a liberação de novos cultivares de feijoeiro comum se condiciona a incorporação de um *pool* de alelos relacionados à resistência para possibilitar assim produção por maior período de tempo. Isto tem sido realizado com a transferência de alelos presentes em cultivares resistentes para os suscetíveis (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994).

Na interação *P. vulgaris* e *C. lindemuthianum*, estudos genéticos indicam que a resistência à antracnose está relacionada a *loci* multi-alélicos (YOUNG et al., 1998; MELOTTO; KELLY, 2000) que compreendem em sua maior parte genes de herança dominante, denominados de *Co* (MELOTTO; BALARDIN; KELLY, 2000; KELLY; VALLEJO, 2004). Neste contexto, o genótipo mexicano G2333 (Colorado de Teopisca) se destaca nos programas de melhoramento genético do feijoeiro, devido à presença de alelos múltiplos caracterizados e consequente ampla resistência a diversas raças do patógeno da antracnose. Este genótipo foi utilizado como parental recorrente para obtenção da linhagem melhorada SEL 1308, que herdou o alelo $Co\text{-}4^2$ e resistência a 97% das raças descritas. Esta linhagem tem sido utilizada como parental resistente de uma grande população de mapeamento (>1000 F_2 indivíduos) usada para identificar marcadores moleculares para o gene $Co\text{-}4^2$. Este gene pode ser considerado um importante para clonagem molecular, não somente devido a sua resistência ampla, mas

também devido à disponibilidade de marcadores já caracterizados (YOUNG et al., 1998, MELOTTO; KELLY, 2001, MELOTTO et al. 2004).

O cultivar resistente a antracnose contendo o gene *Co* responde à inoculação do patógeno a partir de uma interação incompatível. Esta se inicia com a inoculação do fungo patogênico, provocando na planta hospedeira variações fisiológicas e rápidas mudanças de expressão gênica que ativam respostas de defesa. No local infectado ocorre a formação de pontos necróticos típicos de uma reação de hipersensibilidade (RH), resultando num crescimento limitado do fungo. A RH, tida como a resposta primária da planta ao ataque do patógeno, é caracterizada por uma reação oxidativa devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MEHDY, 1994; BOLWELL et al. 2002). Esta resposta inicial da planta pode ser considerada definitiva na determinação da resistência em relação ao agente patogênico.

2.4 Interação de incompatibilidade hospedeiro-patógeno

Diferente dos animais, as plantas não possuem um sistema imune específico para combater os invasores, entretanto desenvolveram sistemas robustos de defesa durante interação hospedeiro-patógeno. Estes sistemas podem ser considerados constitutivos (passivo), englobando os mecanismos pré-existentes; ou induzíveis (ativos), que são ativados após a infecção pelo patógeno. No primeiro caso, podem ser consideradas as barreiras físicas da planta tais como cutícula; casca lenhosa das árvores; e espessamento da parede celular com suberina e lignina. Por outro lado, os mecanismos ativos são caracterizados pela participação de proteínas estruturais ou outros polímeros presentes nas membranas ou parede celular do hospedeiro ou patógeno, que podem agir como sinalizadores ou receptores. Além disso, podem ser considerados os metabólitos pré-formados de ambos os organismos, que podem atuar como inibidores ou toxinas; e enzimas liberadas ou ativadas, que podem alterar as vias metabólicas ou reagir com os substratos nas células. Finalmente, este sistema pode alterar as expressões das informações genéticas, através da ativação e repressão de genes (LUCAS, 1998; LEITE; STANGARLIN, 2008).

Na resposta ativa da planta se destacam os mecanismos de defesa específicos que evoluíram na interação constante entre hospedeiro-patógeno, resultando num modelo

gene-a-gene (FLOR, 1956; 1971). Neste, o reconhecimento específico ocorre quando o gene de resistência (*R*) interage com o correspondente gene avirulento (*avr*) presente no patógeno. O modelo tem como base a predição de que os produtos do gene *R* estejam presentes como receptores nas membranas das células do hospedeiro enquanto o gene *avr* codifica sinalizadores que são secretados ou superfície-localizados nas células e se ligam aos receptores no hospedeiro. Assim, esta interação molecular estimula o complexo de cascatas de respostas precoce na defesa ativa da planta, através de diversos elicitores (moléculas ativadoras das respostas de defesa), tais como polissacarídeos, glicoproteínas e proteínas (Figura 2.2) (HAHN, 1996; BASSE, BOLLER, 1992; GUSTINE; SHERWOOD; MOYER 1995).

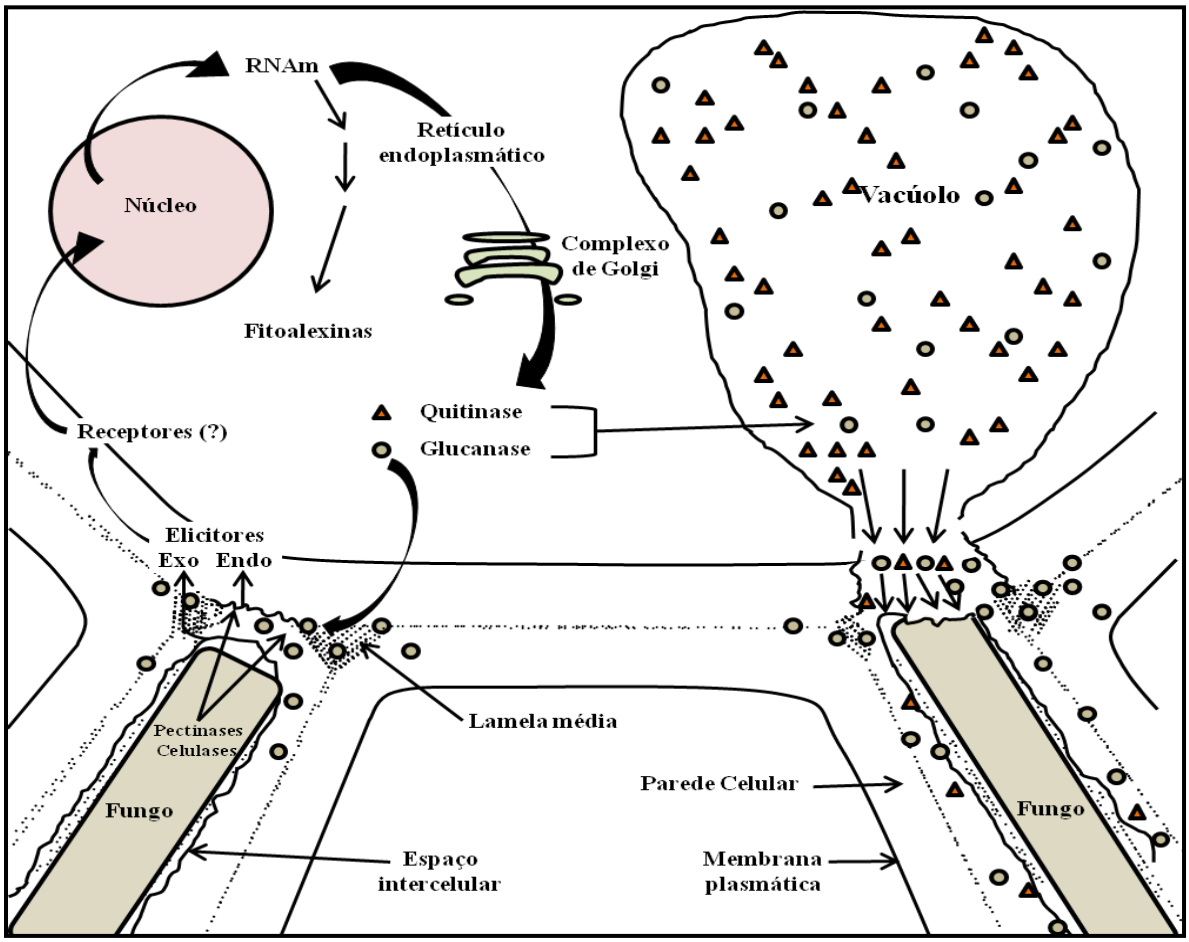
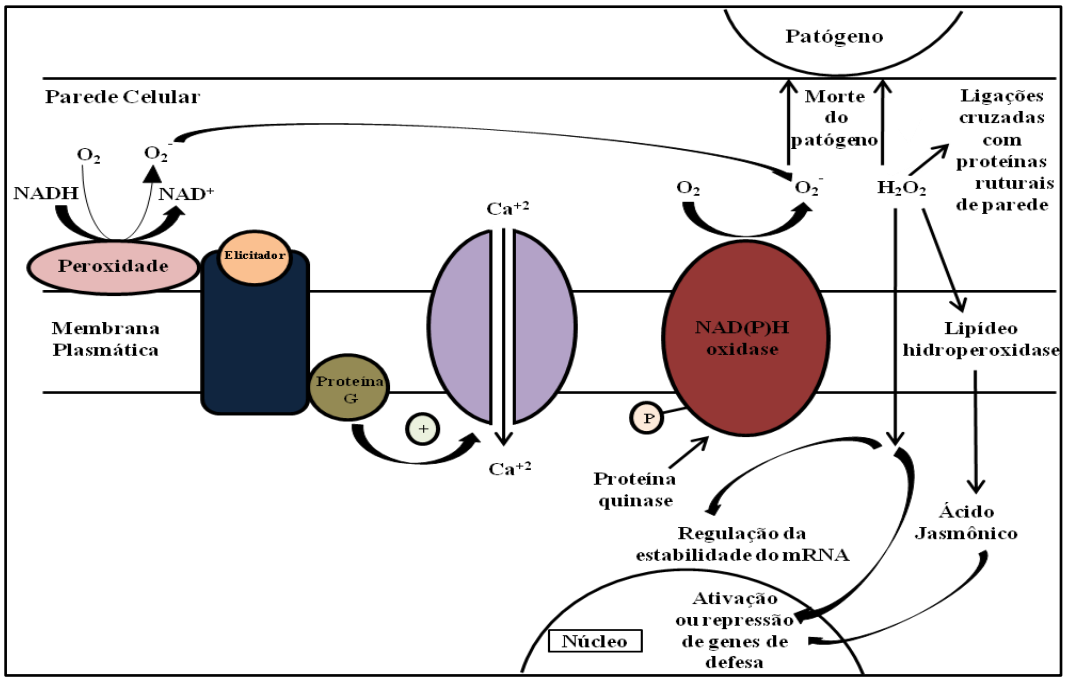


Figura 2.2 – Complexos mecanismos de defesa ativa da planta durante interação do hospedeiro-patógeno, com participação das proteínas relacionadas à patogênese (quitinases e glucanase) (Modificado de Paxton; Groth, 1994)

Os elicitores polissacarídicos podem ser obtidos a partir da hidrólise parcial da parede celular do fungo durante a infecção, devido à presença de enzimas produzidas

pelas plantas, tais como glucanases e quitinases (Figura 2.2). Por outro lado, existem também diversos elicitores de mesma propriedade química originados da degradação da parede celular do hospedeiro, devido a enzimas produzidas pelo patógeno, podendo assim ser destacadas enzimas de pectina que digerem a lamela média da planta (HAHN; DARVILL; ALBERSHEIM, 1981). Além disso, proteínas vegetais que inibem estas enzimas, tais como as poligalacturonases podem evitar a hidrólise total e aumentar assim a meia vida deste tipo de elicitores, que são denominados de oligossacarinas. Assim, a resposta ativa intermediada por estas moléculas pode contribuir para a reação de hipersensibilidade na planta, permitindo que esta possa estabelecer uma interação de incompatibilidade hospedeiro-patógeno (LUCAS, 1998).

Em reações iniciais nas interações de incompatibilidade, a membrana plasmática sofre rápida mudança em suas propriedades (alterações na matriz de lipídios e canais de proteínas) que permitem iniciar outras respostas celulares. Além disso, ocorre uma explosão de atividade oxidativa com a liberação de ânions de superóxido altamente reativo e peróxido de hidrogênio (Figura 2.3). As espécies de oxigênio reativo podem causar a oxidação dos lipídios da membrana, provocando a catálise das reticulações protéicas e danos celulares; e ainda auxiliar no aumento de atividade de várias enzimas, incluindo lipoxigenases, que atuam sobre os lipídios da membrana gerando produtos sinalizadores do processo de defesa. Por outro lado, a presença de peróxido de hidrogênio pode ativar genes para síntese de fitoalexinas, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (GPRH), quitinases e proteínas relacionadas à patogenicidade (RP), além de permitir a formação de ácido jasmônico, tido como um mensageiro secundário das respostas de defesa. Estas respostas combinadas permitem a ocorrência da morte celular localizada e consequente reação de hipersensibilidade ou RH, que pode ser ainda utilizada pela planta como em evento sinalizador para ativação dos sistemas de resistência adquirida (RSA), amplificando assim as respostas de defesa (MEHDY, 1994; BOLWELL et al. 2002). Neste caso, o hospedeiro sacrifica várias células para que o restante da planta possa sobreviver.



Figuras 2.3 – Componentes possivelmente envolvidos na geração de espécies ativas de oxigênio e sua relação com a ativação de mecanismos de defesa das plantas em reações de incompatibilidade com agentes patogênicos (Modificado de Mehdy, 1994)

As fitoalexinas, observadas na RH, possuem diferentes estruturas, que de forma geral se definem como antibióticos de baixo peso molecular, que são sintetizados pelas plantas e acumulados em seus tecidos em resposta a invasão do patógeno (MANSFIELD, 1982). Assim, diferente dos inibidores pré-formados, as fitoalexinas não estão presentes nos tecidos saudáveis, no entanto, a taxa de produção e acúmulo depende dos genótipos e do tipo de interação hospedeiro-patógeno estabelecida (YOSHIKAWA; YAMAUCHKI; MASAGO, 1978; DANIEL; PURKAYASTHA, 1995). Como exemplo, pode ser citado o acúmulo mais precoce da faseolina (fitoalexina do feijoeiro comum) nas plantas sob interação incompatível do que na interação compatível (BAILEY, 1974). Em interação com fungos patogênicos, as fitoalexinas atuam na inibição da germinação e elongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento do micélio (LO et al., 1996).

As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (GRH), que são relacionadas com os eventos oxidativos na reação incompatível, se acumulam na parede celular do hospedeiro e podem contribuir para a resistência através do aprisionamento das células do patógeno ou agindo como barreira estrutural e localizada para depósito de lignina. As GRHs podem mudar de propriedade devido ao aumento na insolubilidade, que contribui para maior enrijecimento da parede celular e aumento da resistência às enzimas digestivas microbianas. A resposta molecular das GRHs ao patógeno se apresenta similar a síntese

das fitoalexinas, apesar ser mais precoce, transiente e mais distante do local da infecção (DOW et al., 1998).

Outro grupo com o papel importante na defesa das plantas são as lectinas, as quais em sua maioria constituem uma classe de proteínas secretoras que acumulam nas paredes celulares ou vacúolos. As lectinas se ligam a diferentes combinações de açúcares presentes em polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos. Estas se aderem à superfície das células contendo resíduos específicos de açucares e podem assim formar parte do sistema de reconhecimento. Por exemplo, uma série ou família de lectinas se ligam a moléculas contendo o açúcar amino N-acetyl glucosamine, o bloco de construção básico da quitina. Esta propriedade permite a proteína agir sobre as hifas dos fungos, diminuindo o seu crescimento e permitindo a rápida atuação dos mecanismos de defesa (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; PEUMAN; van DAMME, 1995).

As proteínas relacionadas à patogenênese, que são sintetizadas em níveis constitutivos no hospedeiro ou podem ser induzíveis durante a interação com o patógeno, são relativamente pequenas, estáveis e acumulam predominantemente nos espaços intercelulares dos tecidos das plantas (van LOON, 1999). Com base nas sequências de aminoácidos, relações serológicas, atividade biológica e enzimática essas proteínas foram agrupadas em 17 famílias [PR1 (função desconhecida); PR2 (β-1,3 glucanase); PR3 (quitinase); PR4 (quitinase); PR5 (proteínas relacionadas à taumatina, toxina fúngica); PR6 (inibidora de proteinase); PR7 (endoproteinase); PR8 (quitinase tipo III); PR9 (peroxidase); PR10 (relacionada à ribonuclease); PR11 (quitinase tipo I); PR12 (defensina); PR13 (tionina); PR14 (proteína transferidoras de lipídeos); PR15 (proteína germina); PR16 (proteína relacionada a germina); PR17 (função desconhecida)] (van LOON et al., 1994, van LOON; REP; PIETERSE, 2006). As diferentes funções das PRs contribuem para sua efetividade nas infecções fúngicas, na atuação sobre a parede celular do patógeno, que contém glucanas, quitinas e proteínas. Assim, estas famílias gênicas podem executar um papel importante no mecanismo de defesa direto das plantas com a diminuição acentuada no crescimento do patógeno, permitindo assim que o hospedeiro tenha tempo de operar os sistemas de defesa. Além disso, nos mecanismos indiretos, a ação enzimática destas proteínas sobre a parede celular do patógeno permite a liberação de moléculas sinalizadoras de reconhecimento da planta (Figura 2.2). Além da importância das proteínas PRs para a ocorrência dos eventos de incompatibilidade, pode ser considerado proteínas semelhantes às PRs com ampla funcionalidade nos processos

básicos da planta. Com isto, pode ser sugerido que nas plantas estas enzimas tenham evoluído como um mecanismo geral de resistência da planta contra o patógeno, bem como um sistema de alerta precoce (van LOON; van STRIEN, 1999).

Outro sistema complementar e importante para a planta estabelecer a interação de incompatibilidade se relaciona com o mecanismo de resposta sistêmica adquirida (RSA), que se caracteriza por uma via de defesa específica de transdução de sinal. Esta permite resistência duradoura e amplamente difundida pela planta, sendo iniciada logo após a inoculação com o patógeno avirulento. Este sistema se relaciona, fortemente, com a expressão de diversas classes de genes que em muitos casos se associam com o metabolismo de compostos fenólicos, tal como o ácido salicílico, o qual é acumulado em níveis elevados no início da RSA em diversas espécies vegetais (RYALS et al., 1996; DELANEY, 1997).

2.5 *Expressed sequence tags* de *P. vulgaris*

O feijoeiro comum possui um genoma pequeno estimado entre 450 e 650 Mb e exibe baixo nível de duplicação de genes e pequenas famílias gênicas (BENNETT; LEITCH, 1995; BROUGHTON et al. 2003). Os estudos genéticos para a espécie têm sido amplamente voltados à obtenção de mapas genéticos, com base em centenas de marcadores moleculares, tais como *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP), *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP) e *short sequence repeats* (SSR) (GEPTS et al., 2008). Por outro lado, estudos voltados para o transcritoma da espécie têm sido mais recentemente abordados.

O estudo de genes expressos de plantas pode ser realizado com eficiência a partir de sequências expressas identificadas ou termo em inglês *expressed sequence tags* (ESTs). Este método tem como base o isolamento, clonagem e sequenciamento de transcritos de diferentes condições gerando informações importantes, tais como marcadores moleculares e caracterização do perfil transcricional da espécie (BROUGHTON et al. 2003). Maior parte dos ESTs de espécies leguminosas depositados no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery) se concentra nas modelos, tais como *Medicago*

truncatula (em torno de 286 mil de ESTs) e *Lotus japonicus* (em torno de 244 mil de ESTs), além da espécie cultivada *Glycine max* (em torno de 1,5 milhões de ESTs).

Recentemente, com o projeto global *Phaseomics*, o consórcio internacional para estudo genômico de *Phaseolus* (BROUGHTON et al., 2003), foram motivados estudos importantes que puderam contribuir para o registro em 2011 de 116.716 ESTs no GenBank de *P. vulgaris* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery). Em 2005, Melotto e colaboradores obtiveram três bibliotecas de ESTs para análise diferencial de genes durante interação incompatível entre o feijoeiro comum e patógeno avirulento do *C. lindemuthianum* da raça 73 (MELOTTO et al., 2005). Neste trabalho, foi possível obter 5.255 ESTs, que foram arranjadas em 569 *tentative contigs* (TC) e 2557 sequências únicas (*singletons*). Em mesmo ano, a partir de transcritos de órgãos de feijoeiro comum submetidos a condições diversas (vagem precoce e maduras; folhas de plantas noduladas e raiz de plantas em deficiência de fósforo) foram obtidas 15781 ESTs agrupadas em 2266 *contigs* e 5703 sequências únicas (RAMIREZ et al., 2005).

2.6 A técnica RT-qPCR para estudos moleculares e genes de referência

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real tem sido considerada um importante método quantitativo de ácidos nucléicos em diferentes tipos de amostras e condições ambientais, devido à alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e amplo desempenho de quantificação dos genes de interesse (BUSTIN, 2000; HEID et al. 1996; BUSTIN, 2002; SHIPLEY, 2006).

O método quantitativo de PCR em tempo real tem como base a obtenção de sinal de fluorescência durante cada amplificação de PCR comum. O fluoróforo utilizado no método pode ser sondas ligadas aos *primers* (ex.: sistema TaqMan) ou moléculas ligantes em fita dupla de ácido nucléico (SYBR Green). Dentre estes, o SYBR® Green I tem sido o mais intensivamente utilizado devido ao baixo custo, facilidade no desenvolvimento do ensaio, onde somente o uso de um par de *primers* é suficiente, além de permitir o uso de mesmo mecanismo de detecção para cada ensaio. A desvantagem se relaciona com a necessidade de *primers* altamente específicos, para evitar a formação de produtos secundários (ex.: dímeros de *prímers*), que possam permitir a ligação das moléculas de

fluoróforo e resultar na geração de ruídos excedentes de fluorescência na PCR (SHIRPLEY, 2006).

Na análise dos níveis de transcritos (RNAm) de uma determina amostra por qPCR em tempo real deve ser realizada uma etapa inicial, onde ocorre a síntese de cDNA a partir da ação da enzima transcritase reversa ou termo em inglês *reverse transcriptase* (RT). Esta atua sobre as moléculas de RNAm da amostra, caracterizando assim a técnica por RT-PCR em tempo real. Em seguida, o PCR quantitativo segue com a amplificação da sequência alvo em quatro fases: 1) linha de base; 2) exponencial; 3) linear; 4) platô (Figura 2.4). Na linha de base a amplificação ocorre de forma indetectável pelo equipamento. Por outro lado, a fase exponencial compreende a detecção precoce de sinais de fluorescência durante reação da PCR onde a amplificação ocorre até a taxa exponencial máxima, resultando na determinação do *threshold* e, consequente, valor de Cq (ciclo de quantificação). Neste caso, em uma reação ideal duas moléculas completas são sintetizadas de cada fita molde disponível na fase exponencial resultando na máxima eficiência (E=100% ou 2). Na fase linear, a eficiência da amplificação inicia a queda até a fase de platô, onde a amplificação cessa rapidamente até o ciclo final (SHIPLEY, 2006) (Figura 2.4).

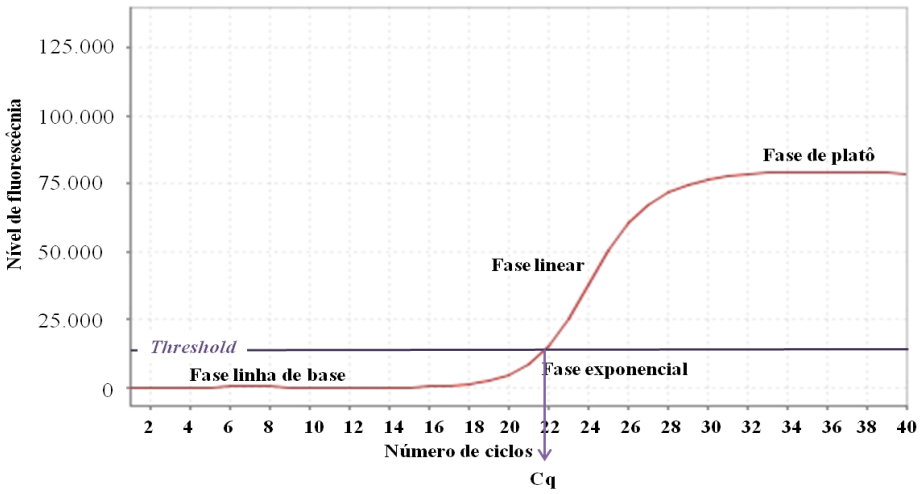


Figura 2.4 – Curva de amplificação de um gene alvo por RT-qPCR em tempo real, representando as fases de amplificação (linha de base, exponencial, linear e platô), o *threshold* e o ciclo de quantificação (Cq) para a amostra

A quantificação dos transcritos pelos métodos quantitativos por RT-PCR em tempo real pode ser realizada no modo absoluto e relativo. No primeiro caso, um gene alvo pode ser quantificado a partir do uso de uma curva padrão, onde se utiliza como base a diluição serial de do gene isolado com concentração conhecida. No segundo caso, a

quantificação relativa permite a análise comparativa dos níveis de expressão de transcritos de interesse entre diferentes amostras submetidas a tratamentos diversos (HEID et al. 1996; BUSTIN, 2002). Portanto, este método tem permitido o desenvolvimento de diversas áreas das ciências: agrária, biológicas, e médica. Dentro deste contexto, diversos trabalhos podem ser incluídos, tais como aqueles envolvidos com quantificação de genes na área microbiana, determinação de dosagem gênica, identificação de transgenes em alimentos transgênicos, avaliação recorrente de câncer e aplicação em estudos forenses (BUSTIN, 2002).

O método quantitativo por PCR possui grande potencial para aplicações analíticas e análise de transcritomas, no entanto, diversas fontes de ruídos devem ser controladas, dentre as quais podem ser citadas: a qualidade e armazenagem do material vivo e RNA isolado; a quantidade inicial de RNA; a especificidade dos *primers* na reação; a eficiência enzimática; a diferenças entre a atividade transcricional dos tecidos e das células; o delineamento do ensaio em cada corrida de PCR no equipamento; e por fim a definição dos valores de eficiência de cada curva de amplificação. Além disso, deve haver preocupação com a necessidade na normalização dos dados brutos obtidos com o uso de normalizadores internos adequados para cada condição avaliada (BURKARDT, 2000; BUSTIN et al., 2009). Portanto, de forma geral na aplicação da técnica de PCR/RT-PCR em tempo real o controle das fontes de ruídos e devida normalização dos dados brutos permitem a obtenção de resultados confiáveis.

Na maior parte dos métodos quantitativos de genes, normalizadores internos eram determinados como genes *housekeeping* ou constitutivos, devido à idéia de que como estes participavam de processos básicos e fundamentais nas células deveriam mostrar níveis de expressões invariáveis entre os tecidos. No entanto, este tipo de gene tem demonstrado variações importantes entre diferentes condições de estresse, tecidos específicos e estágios de desenvolvimento. Assim, o conceito de gene de referência é atualmente o mais aceito para normalização de dados de RT-PCR em tempo real. Isto porque genes de referência são controles internos que são afetados por todas as fontes de variação experimental da mesma forma que os genes de interesse (BUSTIN et al., 2009). Portanto, programas estatísticos, tais como geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004), foram desenvolvidos com objetivo de calcular a estabilidade de candidatos a genes de referência durante as condições experimentais específicas, e assim permitir a obtenção de dados menos enviesados nas análises por métodos quantitativos como o RT-PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ANDRADE, E.M.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões brasileiras. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – RENAFE, 6., 1999, Salvador. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Salvador, 1999. p. 242-244.

BAILEY J.A. The relationship between symptom expression and phytoalexin concentration in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 477–488, 1974.

BASSE, C.W.; BOLLER, T. Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells. *N*-Linked glycans are essential for activity but act as supressor of the same activity when released from the glycopeptides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 4, p. 1239-1247, 1992.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 76, p. 113–176, 1995.

BOLWELL, G.P.; BINDSCHEDLER, L.V.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.R.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1367-1376, 2002.

BROUGHTON, W.J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Bean (*Phaseolus spp*.)-model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 55–128, 2003.

BURKARDT, H.J. Standardization and quality control of PCR analyses. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 38, n. 2, p. 87-91, 2000.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 29, p. 29-39, 2002.

_____. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 611-622, 2009.

CHRISPEELS, M.J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, Baltimore, v. 3, n. 1, p. 1-9, 1991.

DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R.P. **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker, 1995. 615 p.

DELANEY, T.P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, Rockville, v. 13, p. 5-12, 1997.

DOW, J.M.; DAVIES, H.A.; DANIELS, M.J. A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, p. 1085–1093, 1998.

FAO. **FAOSTAT Online Statistical Service**. Rome, 2009. Disponível em: http://faostat.fao.org. Acesso em: 20 fev. 2009.

FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, New York, v. 8, p. 29-54, 1956.

_____. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

GEPTS, P.; ARAGÃO F.J.L.; De BARROS E.; BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.J.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; McCLEAN P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical**: crop plants. Berlin: Springer, 2008. v. 1, cap. 5, p. 113-143.

GRAHAM, P.H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, p. 131–146, 1997.

GUSTINE, D.L.; SHERWOOD, R.T.; MOYER, B.G. Evidence for a new class of peptide elicitor of hypersensitive reaction from the tomato pathogen *Pseudomonas corrugate*, **Phytopatology**, Lancaster, v. 85, p. 848-853, 1995.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAHN, M.G.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 1161-1169, 1981.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 986–994, 1996.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2010. v. 23, n. 12, p. 1-80.

KELLY, J.D.; VALLEJO, V.A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **HortScience**, Alexandria, v. 39, n. 6, p. 1196–1207, 2004.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: Galli, F. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. cap. 19, p. 297-318.

LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. Fisiologia e bioquímica de doenças fúngicas. In: PASCHOLATI, F.S.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 115-152.

LO, L.C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl etherluteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 21-31, 1996.

LUCAS, J.A. **Plant pathology and plant pathogens**. Oxford: Blackwell Science, 1998. 288 p.

MAHUKU, G.S.; JARA, C.E.; CAJIAO, C.; KELLY, J.D.; KIRK, W.W. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, St.Paul, v. 86, p. 1383-1387, 2002.

MANSFIELD, J.W. The role of phytoalexins in disease resistance. In: BAILEY J.A.; MANSFIELD, J.W. (Ed.). **Phytoalexins**. New York: John Wiley and Sons, 1982. p. 253-288.

MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 467-472, 1994.

MELOTTO M.; KELLY J.D. An allelic series at the Co-1 locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 143-149, 2000.

_____. Fine mapping of the *Co-4* locus of common bean reveals a resistance gene candidate, *COK-4*, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 508-517, 2001.

MELOTTO, M.; BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St Paul, MN: APS Press, 2000. p. 346-361.

MELOTTO, M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BRUSCHI, A.G.; CAMARGO, L.E. Comparative bioinformatic analisys of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome**, Ottawa, v. 48, p. 562-570, 2005.

MELOTTO, M.; COELHO, M.F.; PEDROSA-HARAND, A.; KELLY, J.D.; CAMARGO, L.E.A. The anthracnose resistance locus *Co-4* of common bean is located

on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 4, p. 690-699, 2004.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. **7**, p. 352–356, 2002.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. A modified Giemsa technique for identifying bean chromosomes. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 67, n. 3, p. 187-188, 1976.

O'CONNEL, R.J.; BAILEY, J.A.; RICHMOND, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 27, p. 75-98, 1985.

O'CONNELL, R.J.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARAZANIGA, R.; BAILEY, J. A.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Host specificity, pathology, and host–pathogen interaction**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2000. p. 57–77.

PASTOR-CORRALES, M.A.; TU, J.C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 77-104.

PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M.; MOLINA, A.; SINGH, S.P. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 1, p. 63-67, 1995.

PAXTON, J.D.; GROTH, J. Constraints on pathogens attacking plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 13, p. 77-95, 1994.

PEUMANS, W.J.; van DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

RAMIREZ. M.; GRAHAM, M.A.; BLANCO-LOPEZ, L.; SILVENTE, S.; MEDRANO-SOTO, A.; BLAIR, M.W.; HERNANDEZ, G.; VANCE, C.P.; LARA, M. Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 4, p. 1211-1227, 2005.

RAVA, C.A.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, p. 167-172, 1994.

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

SILVA, K.J.D. **Distribuição e caracterização de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* no Brasil**. 2004. 66 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). ***Colletotrichum***: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A.; SINGH, S.P. New source of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 31, p. 741-754, 1982.

SHIPLEY, G.L. An introduction to real-time PCR. In: DORAK, M.T. (Ed.). **Real-time PCR**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 1-31.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; van ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034.1-RESEARCH0034.11, 2002. *On line.*

van LOON, L.C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Ed.). **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 1-19.

van LOON, L.C.; van STRIEN E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

van LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 12, p. 245-264, 1994.

van LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135–162, 2006.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P.; CARNEIRO, J.E.S. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. p. 301-391.

THROWER, L.B. Terminology for plant parasites. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 56, p. 258-259, 1996.

TU, J.C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: Population dynamics of the pathogen and breeding for disease resistance. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). ***Colletotrichum***: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. p. 203-224.

YOSHIKAWA, M.; YAMAUCHKI, K.; MASAGO, H. Glyceollin: its role in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma var. sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, p. 73-82, 1978.

YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic resistance in the differential cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 87–94, 1998.

3 GENES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE RT-qPCR EM FEIJOEIRO COMUM EM INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL COM O PATÓGENO DA ANTRACNOSE

RESUMO

A seleção de genes de referência é o estágio essencial para aumentar a precisão e acurácia da análise de expressão relativa pelo método quantitativo RT-PCR. A estabilidade de oito sequências alvos foi avaliada para definir os genes de referência em potencial para na análise de expressão de genes alvos de feijoeiro durante interação incompatível com a raça 73 do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, considerando diferentes tecidos (folha, epicótilo e hipocótilo) e períodos de inoculação (48 e 96 horas). Dez possíveis genes de referência foram determinados *in silico*, sendo oito utilizadas para analisar a expressão diferencial de um gene alvo (gene para *PvPR2*). A eficiência das curvas de amplificação (E) e ciclo de quantitaficação (Cq) foram determinados usando o programa LinRegPCR. Os valores de estabilidade dos possíveis genes de referência foram obtidos a partir dos programas geNorm e NormFinder enquanto as análises estatísticas e normalização da expressão diferencial do gene *PvPR2* foram definidas pelo programa REST. Alta estabilidade foi observada para os genes *InsDeg*, *Act2*, *Ukn1* e *Ukn2*. No entanto, os genes *InsDeg* e *Act2* foram indicados como a melhor combinação de genes de referência para análise de estresse biótico. Estes genes devem ser úteis na normalização de expressão de gênica através da análise de RT-qPCR em feijoeiro comum, a espécie comestível mais importante.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. *Colletotrichum lindemuthianum*. Genes de referência. Condições de estresse.

ABSTRACT

Selection of reference genes is an essential consideration to increase the precision and quality of relative expression analysis by the quantitative RT-PCR method. The stability of eight expressed sequence tags was evaluated to define potential reference genes to study the differential expression of resistant common bean (SEL 1308) target genes during incompatible interaction with race 73 of fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, considering different tissues (leaf, epicotyls and hypocotyl) and period of inoculation (48 and 96 hours). Ten candidate reference genes were defined *in silico*, whose eight were used suitable to differential gene expression of the target gene (*PvPR2* gene). The efficiency of amplification curves and quantification cycle (Cq) were determined using LinRegPCR software. The stability of the candidate reference genes was obtained using geNorm and NormFinder software, whereas the normalization of differential expression of target genes [*PvPR2* gene] was defined by REST software. High stability was obtained for *InsDeg*, *Act2*, *Ukn1* and *Ukn2* genes. However, *InsDeg* and *Act2* were indicated as the best combination of reference genes for biotic stress analysis. By combination of these genes as normalizers, the *PvPR2* gene showed significant up regulation ($p<0.05$) and low standard error values, resulting in validation of data. These genes should be useful in the normalization of gene expression by RT-qPCR analysis in common bean, the most important edible legume.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; *Colletotrichum lindemuthianum*; normalizer genes; stress Conditions

3.1 INTRODUÇÃO

A técnica baseada em PCR em tempo real tem demonstrado importantes atributos tais como, acurácia, precisão e relativa facilidade de uso devido à velocidade, sensibilidade e especificidade (BUSTIN, 2000). Considerando estas características, o método tem se destacado em diversas áreas de pesquisa, tais como ciência da vida, medicina e estudo forense (BUSTIN et al., 2009). Apesar destas vantagens, esta técnica quantitativa está sujeita a diversas fontes de erro, tais como eficiência na síntese de cDNA, o uso de diferentes indivíduos, ou ainda variações nas quantidades de DNA ou RNA iniciais (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004). Assim, a confiabilidade da técnica se relaciona com a necessidade de cuidado com as condições experimentais e principalmente, com a escolha dos controles internos, evitando obtenção de dados e análises estatísticas enviesadas.

Os genes relacionados a processos básicos e estruturais nas células (*β-tubulina*, *β-actina*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, *subunidades ribossomais*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, *ubiquitina*, dentre outros) eram intitulados de *housekeeping* (genes de expressão constante), sendo utilizados diretamente como normalizadores em ensaios quantitativos (TRICARICO et al., 2002). No entanto, diversos trabalhos têm reportado expressões variáveis para estes tipos de genes em diferentes condições e tecidos específicos (THELLIN et al., 1999; CORDOBA et al., 2011; CZECHOWSKI et al., 2005). Com isso, existe concordância com a necessidade de realizar procedimentos fundamentais, tais como selecionar genes caracterizados por baixa variação nos níveis expressão para testes de validação e determinação da melhor combinação de controles internos em tratamentos específicos (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004). Além disso, o uso de fator de normalização a partir de múltiplos genes de referências tem sido recomendado para normalização de níveis de expressão de genes alvos pela técnica de RT-PCR quantitativo (VANDESOMPELE et al., 2002). Portanto, deve ser assegurado que os controles internos sejam caracterizados por alto nível de estabilidade em diferentes tecidos e estágio de desenvolvimento, sendo esta expressão independente dos parâmetros experimentais (BUSTIN, 2000).

Estudo com análise de genes de referências tem se concentrado em estudo envolvendo área médica (BUSTIN, 2002), enquanto poucos trabalhos tem sido reportados

para plantas, podendo ser citados estudos com *Arabidopsis thaliana* (CZECHOWSKI et al., 2005), arroz (JAIN et al., 2006), tomate (LOVDAL; LILLO, 2009), trigo (PAOLACCI et al., 2009) e soja (LIBAULT et al., 2008; HU et al., 2009). Além disso, pelo o nosso conhecimento, um estudo detalhado sobre normalizadores adequados para *Phaseolus vulgaris* ainda não foi reportado, o qual foi restrito ao registro de uma pequena avaliação de três candidatos a controles internos em biblioteca de ESTs da espécie em interação com o fungo *Uromyces appendiculatus* (THIBIVILLIER et al., 2009).

A cultura do feijoeiro comum pertence a espécie leguminosa de maior importância para o consumo direto humano, servindo como fonte de proteínas e minerais (GEPTS et al., 2008). Devido a esta importância e ao desenvolvimento de diversos projetos envolvendo análise trancricional, número maior de sequências expressas identificadas ou *expressed sequence tags* (ESTs) de *P. vulgaris* tem sido disponibilizada no bando de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (116.716 ESTs, registrado em 2011) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest). Este importante recurso genômico acumulado em poucos anos facilita a análise quantitativa de transcritos de interesse através de RT-qPCR, o que eleva a necessidade de controles internos.

Neste trabalho, 10 sequências de possíveis genes de referência para feijoeiro comum foram selecionadas pela análise *in silico*, para, subsequente, análise e obtenção de genes de referências adequados ao tratamento de interação incompatível feijoeiro e *Colletotrichum lindemuthianum*, considerando diferentes tecidos vegetais e períodos de inoculação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A inoculação e a coleta de material vegetal foram realizadas no laboratório de Biologia Celular e Molecular, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA – USP), Piracicaba, SP. O agente patogênico foi cedido pela Dra. Adriane Wendland da EMBRAPA arroz e feijão (Goiânia – GO) e enviado ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do IAC (Campinas – SP) para cultivo e preparação dos inóculos da raça 73 do fungo *C. lindemuthianum*. No Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Grãos e Fibras do IAC (Campinas – SP) foi realizada ainda a verificação da raça do patógeno.

3.2.1 Material Biológico

3.2.1.1 Material vegetal

O genótipo SEL 1308 de *P. vulgaris* é uma linhagem melhorada para resistência a antracnose que contém o gene *Co-4*^{2}, obtida pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia). Esta linhagem é derivada de um cruzamento entre *P. vulgaris* 'Talamanca' e o parental recorrente Colorado de Teopisca (G2333), que é resistente a 97 % de todas as raças de *C. lindemuthianum* que causam antracnose no feijoeiro comum. Ela também é o parental resistente de uma grande população de mapeamento (>1000 F_2 indivíduos) usada para identificar marcadores moleculares para o gene *Co-4*^{2} (YOUNG et al. 1998; MELOTTO; KELLY, 2001). Como controle positivo foi utilizada a variedade suscetível a raça do patógeno estudado (Black Magic), a qual deve apresentar os sintomas após sete dias após inoculação.

As sementes de feijão foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 10 % (v/v) durante 10 min, lavadas em água esterilizada e colocadas para germinar em papel filtro no escuro e temperatura ambiente (± 25°C) por quatro dias. Em seguida, plântulas foram transferidas para vasos com substrato comercial, constituindo-se assim 3 plântulas por vaso, sendo 2 vasos reservados para cada período no tratamento inoculado [48 e 96 horas após inoculação (hai)] e não inoculado (48 e 96 horas), resultando num total de 8 vasos de SEL 1308. Foi mantido nas mesmas condições um vaso da variedade suscetível (3 plântulas) inoculada para verificar os sintomas após 7 dias de interação com o patógeno.

3.2.1.2 Preparo do inóculo do patógeno e inoculação das plântulas

O cultivo e preparo do patógeno, tecido vegetal foi colocado em meio de cultura Mathur, durante 10 dias no escuro, a temperatura ambiente, sendo utilizados esporos com sua concentração com 1,0 x 10^6 esporos/ml (MELLOTO; KELLY, 2000) para inoculação de plântulas de 10 dias (tratamento inoculado). Em seguida, os vasos com as plantas inoculadas e não inoculadas, foram embalados com plástico translúcido, mantendo assim o acesso a luz e umidade necessária (± 100 %). Os vasos foram ainda mantidos em sala

com temperatura e fotoperíodo controlado (± 22°C; 16h de luz: 8h de escuro) para possibilitar as melhores condições ao desenvolvimento do fungo (Figura 3.1).

Para confirmação da raça do agente patogênico, foram utilizadas 12 variedades diferenciadoras de *P. vulgaris* com uma ordem e valores binários pré-definidos (CIAT, 1990). Através deste sistema, cada raça fisiológica do patógeno pode ser determinada a partir da reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras ao isolado (YOUNG et al. 1998). Neste sistema, o patógeno recebe o valor binário de todas as variedades que se apresentarem suscetível. Este valor é somado, resultando assim na determinação da raça fisiológica, como representado na Tabela 3.1 (BERALDO, 2007).

Tabela 3.1 – Relação das 12 variedades diferenciadoras de feijoeiro pré-definidas para classificação das raças fisiológicas de *C. lindemuthianum*

Ordem	**Variedades diferenciadoras**	**Valor binário**	**Exemplos de isolado**	
			Peru	**Costa Rica**
1	Michelite[b]	1	R (0)	S (1)
2	MDRK[a]	2	S (2)	R (0)
3	Perry Marrow[a]	4	S (4)	R (0)
4	Cornell 949242[b]	8	R (0)	S (8)
5	Widusa[a]	16	R (0)	S (16)
6	Kaboon[a]	32	R (0)	R (0)
7	México 222[b]	64	R (0)	S (64)
8	PI 207262[b]	128	R (0)	S (128)
9	TO[b]	256	R (0)	S (256)
10	TU[b]	512	R (0)	R (0)
11	AB 136[b]	1024	R (0)	S (1024)
12	G 2333[b]	2048	R (0)	S (2048)
	Raça[1]		**6**	**3545**

[1]A obtenção da raça se faz a partir da soma dos valores binários das variedades diferenciadoras suscetíveis.
[a]Genótipos Andinos; [b]Genótipos Mesoamericanos. (Modificado de Beraldo, 2007)

Figura 3.1 Inoculação do patógeno e manutenção dos tratamentos resistente e suscetível inoculado e não inoculado mantidos sob condição de alta umidade, fotoperíodo e temperatura controlada

3.2.2 Coleta do material vegetal

Para cada tratamento foi realizado *bulk* de tecido para folha (F), epicótilo (E) e hipocótilo (H) SEL 1308. Para cada período estudado, 48 e 96 horas, foram selecionadas cinco plântulas, aleatoriamente, entre os dois vasos, das quais foram separadas as folhas, os epicótilos e os hipocótilos das cinco plântulas, formando assim seis *bulk* para cada tecido, período e tratamento (ex.: F - 48/96 horas - inoculado/não inoculado) (Figura 3.2). O material vegetal foi coletado, embalado em papel alumínio e, prontamente, congelado com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenado a -80°C. O experimento foi repetido três vezes em épocas diferentes.

Figura 3.2 Coleta do material vegetal, separação dos órgãos vegetais (h: hipocótilo; e: epicótilo; f: folha) e armazenamento em papel alumínio e posterior congelamento por nitrogênio líquido

3.2.3 Seleção dos genes candidatos e desenho dos *primers*

Os genes candidatos a controle interno foram obtidos de outros trabalhos envolvendo tratamento de estresse, tanto biótico quanto abiótico, em feijoeiro comum e/ou espécies relacionadas (THIBIVIELLIERS et al., 2009; LIBAULT et al., 2008; HU et al., 2009). Assim, para avaliar a expressão diferencial em *P. vulgaris*, 10 sequências gênicas pré-selecionada foram submetidas à análise *in silico*, sendo possível a seleção de ESTs homólogos no banco de dados de *P. vulgaris* (NCBI). Em seguida, foi realizada a verificação funcional dos ESTs no banco de dados de proteínas, considerando sequências não redundantes (NCBI/BLASTX) (ALTSCHUL et al., 1990).

Para desenho dos *primers* foi utilizado o programa *PRIMER* 3 ((http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) considerando os seguintes parâmetros: a) tamanho do produto: 100 – 200 pb; b) tamanho do *primer*: 18 – 22 pb; 3) temperatura de *melting*: 57 – 63°C; 4) quantidade de GC: 40 – 60%. A qualidade dos *primer*s foi analisada a partir da ferramenta *Oligo Analysis* (www.operon.com), a fim de evitar a formação de estruturas secundárias. O DNA e cDNA de SEL 1308 controle (não inoculado) foram utilizados para teste dos *primer*s. O primeiro foi obtido pelo protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), sendo o cDNA obtido a partir do kit SuperScrit RT-PCR (Invitrogen). Neste último caso ao final do processo é sintetizado cDNA e amplificado os fragmentos de interesse. No entanto, para uso da fita de DNA/cDNA como molde, cada reação de amplificação de 25 µL com os *primer*s desenhados (Tampão 1X; 3mM $MgCl_2$; 0,2 mM DNTPs; 0,2 µM *primer Forward*/*Reverse*; 20 ng DNA/cDNA, 5 U *Taq polimerase*) foi submetida as seguintes condições: um ciclo por 10 min a 94°C para ativação da enzima Taq DNA polimerase e desnaturação de moléculas; 40 ciclos para amplificação do DNA/cDNA de 30 s a 94°C para denaturação das moléculas, 30 s a 55°C para anelamento dos *primers* e 1 min a 72°C para extensão dos fragmentos; e um ciclo final de 7 min a 72°C para extensão final dos fragmentos. A qualidade das sequências gênicas foi observada separando os produtos de amplificação ao sistema eletroforético em gel de agarose 2%.

3.2.4 Extração do RNA total

Para cada tratamento, o material vegetal foi submetido ao kit reagente TRIzol® (TRIzol® *Reagent Kit*, Invitrogen) modificado, sendo o procedimento realizado como descrito abaixo:

- Cem miligramas de tecido vegetal foi homogeneizado (vortex por 40 s) em 1 mL de TRIzol (manutenção por 5 min em temperatura ambiente);
- Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e realizada a homogeneização manualmente por inversão dos tubos por 15 s (manutenção por 3 min em gelo);
- As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min (4°C);
- O sobrenadante (500-600 µL) foi transferido para um novo tubo contendo 500 µL de isopropanol (homogeneização por inversão);
- As amostras foram incubadas por 10 min em gelo;
- As soluções foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min (4°C), promovendo a visualização do RNA precipitado (*pellet*);
- O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA lavado com 1 mL de etanol 75%;
- As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 min (4°C);
- O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de RNA seco parcialmente por 10 min em gelo;
- A ressuspensão do RNA foi feita com 20 µL de água DEPC 0,1%;
- As amostras foram incubadas por 10 min a 60°C; e estocadas a -20°C até a sua utilização.

A análise de qualidade e quantificação do RNA total isolado foi realizada a partir do espectrofotômetro (Nanodrop 2000c), considerando uma relação ideal absorbância ($1,8 \leq A_{260/280} \leq 2,0$), e da visualização dos padrões de bandas do RNA total que foi realizada em gel de agarose 1,5%. Em adição, para garantir a purificação do RNA foi realizada o tratamento com DNAse, a partir do kit da DNAse1, RNAse-Free (Fermentas).

3.2.5 Curva de amplificação

Para melhor precisão dos dados, a amplificação dos genes candidatos nos tratamentos controle e inoculado foram realizados numa mesma placa de qPCR. A reação de amplificação destes genes e análise do gene alvo foram realizados no equipamento StepOnePlus Applied Biosystem em um único passo usando 100 ng de RNA total e kit 2X Sensimix^{TM} SYBR & ROX one-Step (Peqlab). As condições de amplificação foram realizadas da seguinte forma: um ciclo por 10 min a 42°C para síntese de cDNA e 10 min a 95°C para denaturação da transcriptase reversa e ativação da Taq DNA polimerase; 40 ciclos de amplificação do cDNA de 15 s a 95°C para denaturação, 30 s a 60°C para anelamento dos *primers*, 30 s a 72°C para extensão dos fragmentos e captação do sinal de fluorescência pelo equipamento. A etapa final compreende a curva de *melting* do *primers* que inclui um ciclo final de 15 s a 95°C para denaturação dos fragmentos e registro dos níveis de fluorescência a cada variação de 0,7°C, com temperatura inicial 60°C e final 95°C. Para cada condição, três replicatas experimentais foram utilizadas.

3.2.6 Análises dos dados

O desenho esquemático dos procedimentos para análise dos dados é representado pela Figura 3.3.

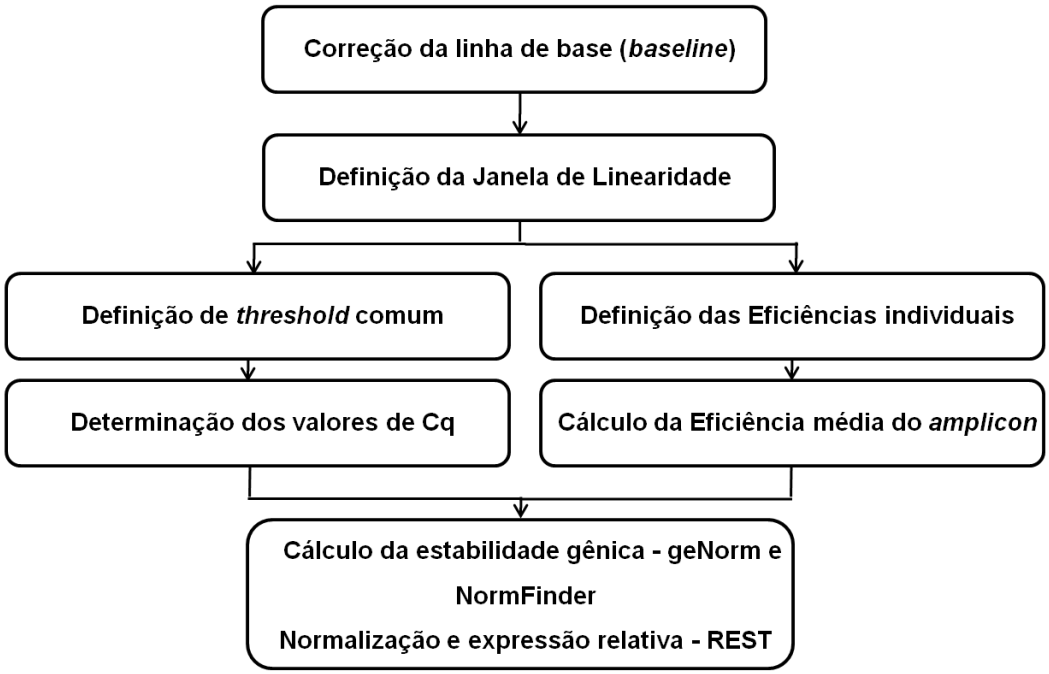


Figura 3.3 - Etapas realizadas para cálculo doa eficiência de amplificação e ciclo de quantificação (Cq) no LinRegPCR para análise estatística nos programas geNorm, NormFinder e REST

Os dados brutos (dados sem correção da linha de base) dos níveis de fluorescências foram submetidas ao programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Esta plataforma realiza a correção da linha de base e uma regressão linear para cada curva de amplificação. Além disso, o programa define um conjunto de pontos em cada curva onde dados melhor correlacionados (janela de linearidade), podendo obter o valor do *threshold*, o ciclo de quantificação (C_q) e reta cuja inclinação é utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação em cada curva ($E = 10^{slope}$). Valores ideais de E ($1,8 \leq E \leq 2$) e correlação ($R \geq 0,995$) foram considerados. Para poder fazer a comparação entre as amostras foi definido um único *threshold* para todas as curvas analisada (Figura 3.4).

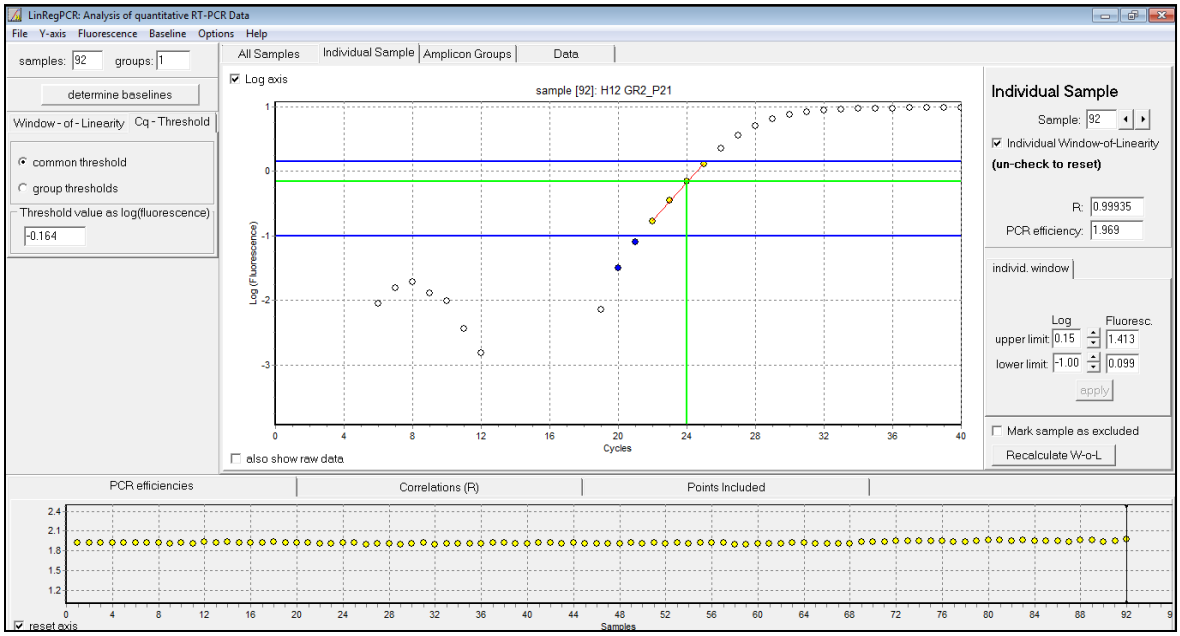


Figura 3.4 - Exemplo de análise dos dados no programa LinReg, com o *threshold* comum, e amplitude de valores de eficiência e correlação ideais para cada curva de amplificação

A estabilidade da expressão de cada gene candidato foi obtida a partir dos programas geNorm versão 3.5 (VANDESOMPELE et al., 2002) e NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) que tem como base o método Ct ou, mais recentemente denominado de Cq, no qual os dados são linearizados, através da transformação dos valores de Cq em quantidade relativa (Q) fixando o maior valor de Cq e utilizando o valor de eficiência média do *amplicon* no tratamento (E). Para isto, aplicou-se a fórmula denominada delta-Cq (Equação 2.1):

$$\text{Equação 2.1: } Q = (E_{gene})^{\Delta Cq_{(menor-maior)}}$$

O programa geNorm tem como base determinar o nível da variação de expressão em pares (*pairwise*) para cada gene em comparação com os outros genes candidatos na análise, determinando assim o desvio padrão das expressões relativas transformadas logaritmicamente. A partir disto, a medida de estabilidade dos níveis de expressão dos gene analisados (valor de *M*) é obtida como a média da variação em pares, comparando um gene em particular com todos os demais genes candidatos incluídos na análise. Assim, valores baixos de *M* caracterizam os genes com expressão mais estável. Em seguida, para posicionamento de genes candidatos (menos estável para o mais estável), o programa

realiza a eliminação sequencial dos genes menos estáveis (alto valores de *M*) gerando um posicionamento dos genes de acordo com os valores de *M* e resultando na identificação dos genes com as expressões mais estáveis nas amostras.

Para a obtenção do número ideal de genes candidatos, o programa geNorm obtém a estimativa do fator de normalização (NF_n) através do cálculo da média geométrica dos níveis de expressão dos *n* melhores genes de referência. A otimização do número de genes de referência inicia com a inclusão dos dois genes mais estáveis ou com os menores valores de *M*, continuando sequencialmente adicionando os genes com maiores valores *M*. Desta maneira, o programa calcula a variação em pares (V_n/V_{n+1}) entre os dois fatores de normalização sequenciais NF_n e NF_{n+1} contendo um número aumentado de genes a cada comparação (VANDESOMPLE et al., 2002).

Diferente do programa geNorm, o programa NormFinder computa os valores de Q de forma a serem submetidos ao *model-based*, onde a seleção dos genes dos melhores normalizadores se baseia na variação intergrupo e intragrupo. Esta técnica é importante de ser usada já que comparando com o método em pares, o *model-based* não é sensível a genes que participam de mesmo processo celular, o que pode resultar em combinação de melhores normalizadores com valores de variação de expressão próximos, porém não necessariamente aqueles representando valores mais estáveis (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004).

Como as análises utilizando o método qPCR em tempo real requer controles internos adequados a diferentes condições de interesse, os cálculos no geNorm e NormFinder foram realizados de maneira a conhecer a estabilidade dos genes candidatos em diferentes condições, órgãos e tratamentos. Assim, foram analisadas as variações médias de expressão relativa dos genes, considerando todas as amostras (diferentes períodos de inoculação, tecidos e tratamentos); diferentes órgãos do controle; e diferentes períodos de inoculação na folha; no epicótilo; e no hipocótilo.

3.2.7 Validação dos genes de referência

Para determinar como o uso de diferentes genes pode afetar a normalização nos dados de expressão para genes alvos, foi calculada a expressão relativa e a diferença significativa no uso de diferentes genes candidatos a controle interno durante estresse biótico. Para isto, foi utilizado o gene da *1,3-beta-D-glucanase*, selecionado a partir de uma biblioteca de ESTs de feijoeiro comum (MELOTTO et al., 2005), sendo os *primer*s da sequência desenvolvidos segundo procedimento previamente descrito (desenho de *primer*s). A expressão do gene alvo nos diferentes períodos e amostras de tecidos obtido de folha foi normalizada por (1) todos os possíveis genes de referência de forma individual; (2) pela melhor combinação obtida no programa geNorm para todas as condições, (3) e por fim pela melhor combinação obtida no NormFinder para todas as condições.

Os valores de expressão relativa normalizados com os respectivos genes de referência e testes estatísticos foram obtidos no programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL et al., 2002), a partir do modelo matemático descrito na eq. 2.2, onde a expressão gênica do alvo é normalizada pelo gene de referência (controle interno). O programa REST compara ainda os valores de Cq do controle e tratamento (amostra) a partir de um teste de realocação fixa aos pares (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*) para definir a significância entre as diferenças de expressão dos genes, com *bootstrap*=2000 permutações.

Equação 3.2: Expressão relativa (ER) = $(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo(controle-amostra)}}}/(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref(controle-amostra)}}}$

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Qualidade e quantificação de RNA total

O RNA total isolado apresentou grande quantidade em cada extração do *bulk* analisados (1000 a 3200 ng/µL para folha; 1000 a 1500 ng/µL para epicótilo; e 500 a

1000 ng/µL para hipocótilo). As amostras apresentaram ainda alta qualidade com valores de $A_{260/280}$ variando de 1,9 a 2,0. Corroborando, com a boa qualidade do RNA total extraído, as bandas no gel de agarose apresentaram-se íntegras e sem contaminação visível de DNA (Figura 3.5). Em seguida, todas as amostras foram tratadas com DNAse como descrito anteriormente.

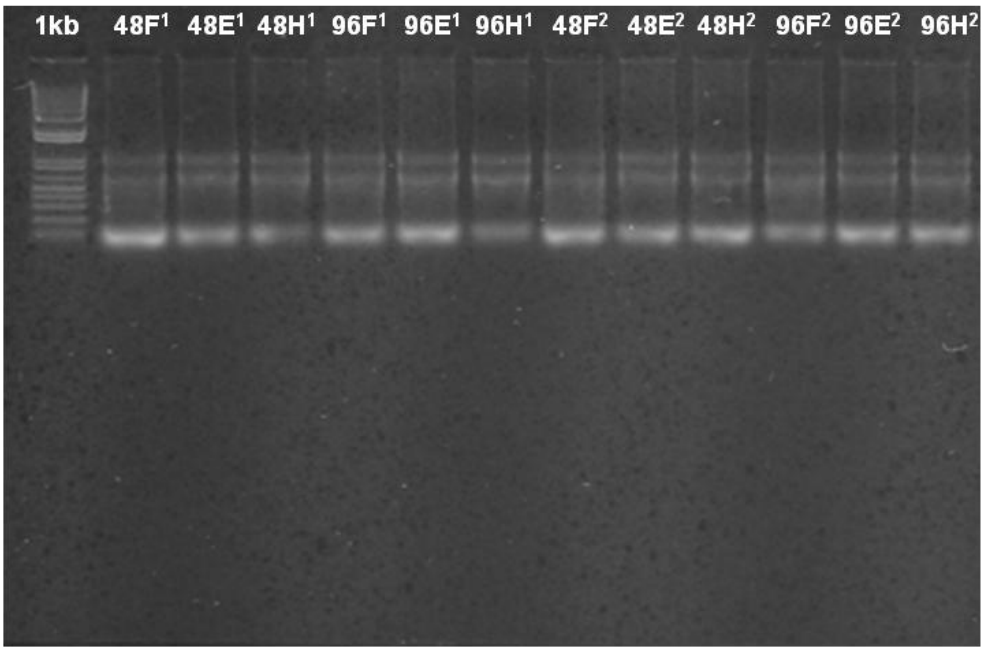


Figura 3.5 - RNA total (2 µg) de folha (F), Epicótilo (E) e hipocótilo (H) de SEL 1308 obtidas da primeira repetição experimental, sem tratamento com DNAse, separadas em gel de agarose 1,5%,.[1]Controle (não inoculado); [2]Tratamento inoculado

Para melhor representatividade das amostras de cada repetição experimental, a mesma quantidade de RNA total de cada uma das repetições, devidamente tratado com DNAse, foi misturada, obtendo-se um novo *bulk* de RNA com concentração final de 100 ng/µL para as amostras controle e tratamento em folha, epicótilo, hipocótilo em cada período estudado. Estes procedimentos foram realizados para minimizar os erros experimentais e aumentar a reprodutibilidade dos dados.

3.3.2 *Primer*s para RT-qPCR: especificidade e eficiência da reação de amplificação

Utilizando o material genômico do feijoeiro e os *primers* desenhados (Tabela 3.2), apenas aqueles utilizados para amplificar os genes para *Tub1*, *InsDeg*, *Ukn2*, *Act2* e *Tub2* apresentaram bandas únicas no tamanho esperado (Figura 3.5). Provavelmente, as sequências moldes utilizadas para desenho dos *primer*s eram produtos de regiões genômicas com a presença de regiões inter-gênicas. Desta forma, foi realizado um teste mais direcionado, com a amplificação das sequências diretamente no cDNA de SEL 1308 controle (não inoculado), obtido de forma previamente descrita.

Tabela 3.2 - Relação dos genes candidatos a normalizadores avaliados em tratamento de estresse biótico em feijoeiro

Gene	**GI NCBI**	**Função**	**Sequência *Forward/Reverse* 5' → 3'**	**T[1] (pb)**	**Tm[2]**	**E[3]**
Ubq	gi|170752836|	*Ubiquitina*	F:AGAAAAGCCCCCAAGTGTTC R:CTGCCATCTCCTTCTTCAGC	161	84,6	1,966
UbqE2	gi|187437085|	*Ubiquitina*	F:TTATGCTGGGGGTGTTTTTC R:TCAACAGGGAGCAAATGGAG	200	-	-
Tub1	gi|171656467|	*Tubulina*	F:TTTCCTTCCCCCAAGGTATC R:TCCCCAAAAGATGGTGTAGC	164	79,4	1,906
InsDeg	gi|171614244|	*Enzima degradante da insulina (IDE)*	F:GCAACCAACCTTTCATCAGC R:AGAAATGCCTCAACCCTTTG	156	81,1	1,929
Skip16	gi|187434529|	*Proteína 16 de interação SKP1/ASK*	F:CACCAGGATGCAAAAGTGG R:ATCCGCTTGTCCCTTGAAC	163	81,5	1,922
Ukn1	gi|187435357|	*Desconhecida*	F:ATTCCCATCATGCAGCAAAG R:AGATCCCTCCAGGTCAATCC	192	79,4	1,922
Ukn2	gi|62707797|	*Desconhecida*	F:CCAATTCAACCATCCCTCAC R:AAACTCCTCTGCACCCTCAG	153	79,4	1,938
Act1	gi|171621346|	*Actina*	F:CCATGTATGTTGCCATCCAG R:CCAAGTCAAGACGGAGGATG	150	-	-
Act2	gi|62703083|	*Actina*	F:TGCATACGTTGGTGATGAGG R:AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	190	79,4	1,944
Tub2	gi|171656465|	*Beta tubulina*	F:AATGTGAAGTCCAGCGTGTG R:CTTCCCCAGTGTACCAATGC	163	80,4	1,954

[1]T: Tamanho do *amplicon*;
[2]Tm: Temperatura de dissociação (*melting*) do *primer* em °C;
[3]E: Eficiência média do *amplicon* para todos os tecidos, condições e tratamento.
\

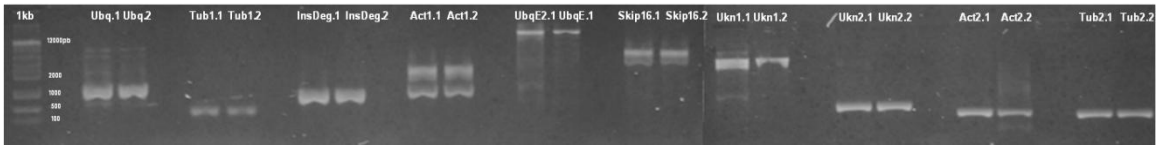


Figura 3.6 - Produtos de amplificação em gel de agarose 2% obtidos de material genômico de fejoeiro SEL 1308 e 10 *primer*s desenhados a partir de sequências gênicas candidatas a genes de referência

A partir do cDNA de SEL 1308 controle, o gene *UbqE2* novamente não revelou a síntese do fragmento esperado, além de formar outros fragmentos de menor intensidade, sendo provavelmente, produtos amplificados de regiões inespecíficas (Figura 3.7), sendo descartado da análise. No entanto, os *primers* para os genes *Ubq*, *Act1*, *Skip16* e *Ukn1* amplificaram os fragmentos de tamanho esperado a partir do transcritoma, corroborando com o fato de existir regiões intergênicas. Assim, para amplificação dos genes em qPCR quantitativo, nove genes foram utilizados para obtenção das curvas de dissociação.

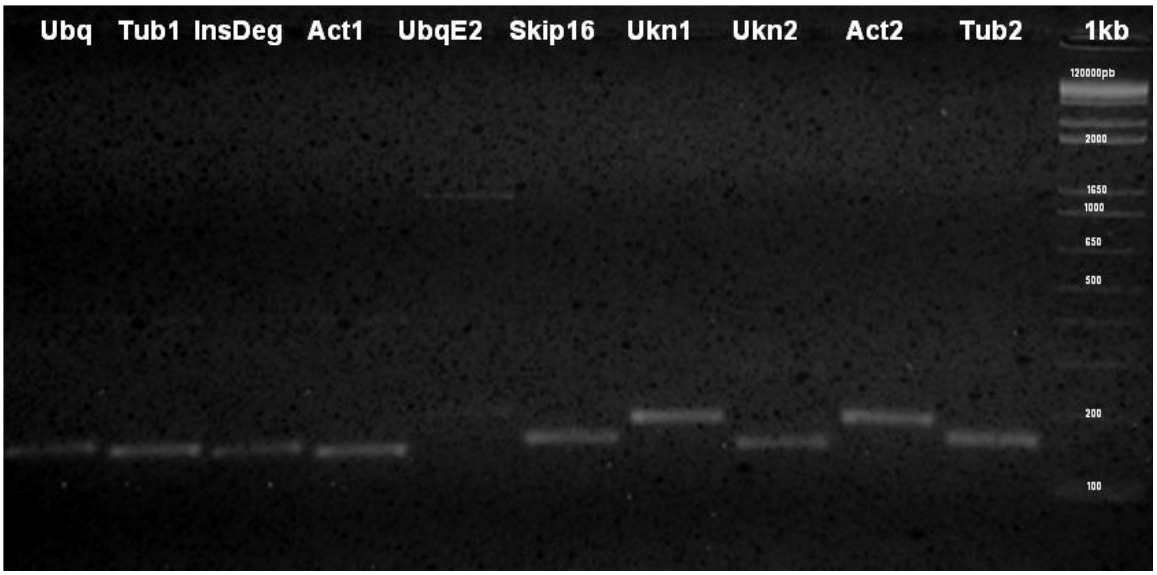


Figura 3.7 - Produtos de amplificação a partir dos dez *primer*s dos possíveis normalizadores selecionados *in silico*, em cDNA de SEL 1308 controle

As curvas de dissociação (*melting curve*) dos *primer*s é outro parâmetro importante na análise da eficiência de amplificação e, consequente, especificidade dos iniciadores. Na figura 3.8, foi possível verificar que dentre os nove genes amplificados pela PCR em tempo real, o gene para a *Act1* apresentou a formação de dois picos de fluorescência, caracterizando a existência de dois fragmentos amplificados, apesar da visualização de um único fragmento no gel. O gel de agarose é bastante informativo, no entanto os fragmentos com quantidade muito baixa são mais facilmente detectados pela técnica de qPCR em tempo real. Portanto, para análise dos genes candidatos a

normalizadores em estudos de expressão diferencial em PCR quantitativo em feijoeiro comum sob estresse biótico, oito pares de *primer*s altamente específicos e com curvas de amplificação com alta eficiência (Tabela 3.2) foram utilizados.

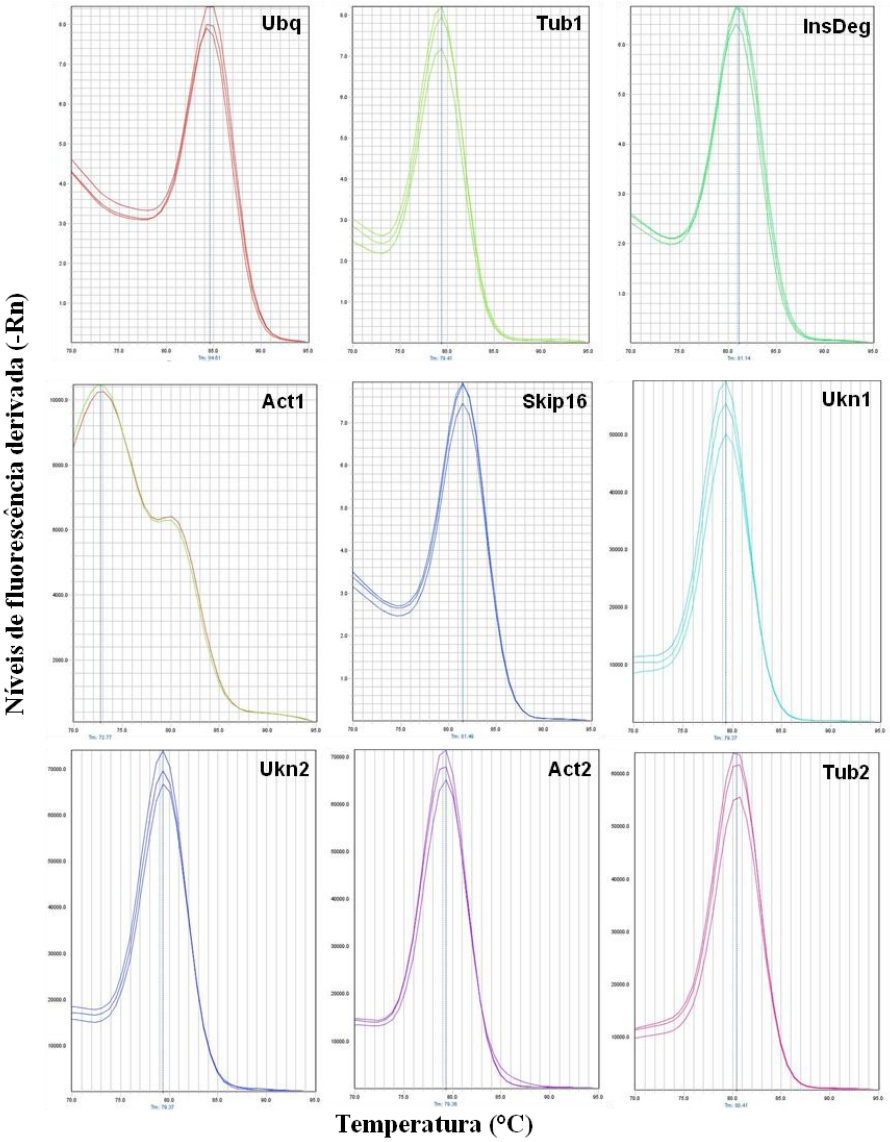


Figura 3.8 - Curva de dissociação a partir de RT-PCR quantitativo de nove genes candidatos a controle interno pré- selecionados em gel de agarose 2%

Considerando todas as condições avaliadas (diferentes tecidos não inoculados e inoculados em diferentes períodos de interação com o patógeno) e avaliando apenas o ciclo de quantificação (Cq), foi verificada uma variação de 19,1 para o gene *Ubq* a 26,5 para o gene *Skip16* (Figura 3.9). Na análise de Cq, assim como para os genes-alvo, sugere-se que os normalizadores tenham valores de Cq menor que 30, para evitar

interferentes na reação e valores maiores que 15, para melhor determinação da linha de base (KARLEN et al., 2007).

Para comprender a influença dos desvios sobre os valores de Cq em cada gene, foi calculado o coeficiente de variação (CV) [(desvio padrão/média aritmética) X 100]. Com base neste parâmetro, o posicionamento dos genes com valores de Cq menos variáveis para os mais variáveis foram *Skip16* (CV=2,43%), *InsDeg* (CV=2,79%), *Ukn2* (CV=2,88%), *Tub2* (CV=2,9%), *Act2* (CV=3,2%), *Ukn1* (CV=3,43%), *Ubq* (CV=4,24%) e *Tub1* (CV=4,41%). Este resultado revela instabilidades baixas nos níveis expressão dos genes analisados nas condições estudadas. Por outro lado, a análise dos Cq é uma etapa inicial, já que para confirmar a estabilidade dos genes analisados nas condições estudadas, é necessário linearizar os dados considerando, além dos valores de Cq, as eficiências das curvas de amplificação.

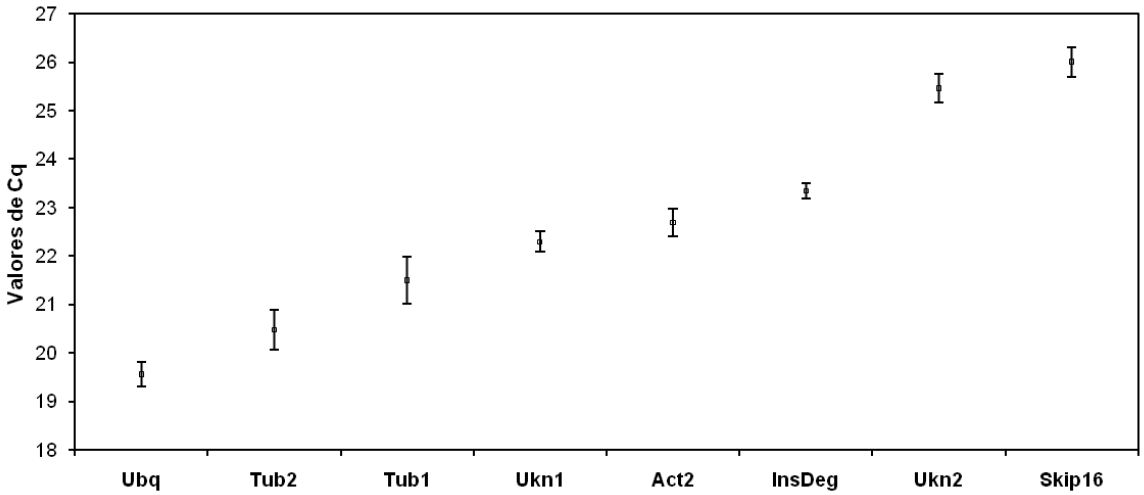


Figura 3.9 - Valores dos ciclos de quantificação (Cq) dos genes candidatos a normalizadores em feijoeiro

Os valores de eficiências das curvas de amplificação obtidos foram elevados demonstrando a qualidade dos *primer*s selecionados e RNA utilizados em cada amostra analisada (Tabela 3.2). A escolha do método para obtenção dos valores de eficiência de amplificação tem sido considerada uma etapa fundamental na obtenção de valores confiáveis de expressões gênicas relativas. Originalmente, para satisfazer a equação 3.1, a eficiência nos cálculos de ER era considerada constante, com valor fixo de 2 (eficiência de amplificação máxima, onde o ciclo posterior tem o dobro de produto do anterior). No entanto, assumir um valor fixo não tem sido recomendado, já que as eficiências das curvas de amplificação podem sofrer alterações importantes devido a diversos tipos de

fatores interferentes na amostra, tais como resíduo de produtos de extração do RNA, resíduo de fluoróforo em excesso na reação de amplificação, ruído do equipamento, entre outros. Portanto, os trabalhos mais recentes têm considerado principalmente o uso de eficiência derivada de uma curva padrão ou da média da eficiência do *amplicon* (RUIJTER et al., 2009).

Para o presente estudo o cálculo das eficiências de amplificação foram realizadas com base na média dos valores de eficiência do *amplicon* obtida da análise individual de cada curva de amplificação (Figura 3.4). Para isto, foi considerada a fluorescência limite (*threshold*) localizada na parte mais elevada da janela de linearidade, sendo esta caracterizada por valores altos de eficiência e correlação. Segundo Ruijter e colaboradores (2009) o ideal seria o uso de eficiências individuais nas análises de expressão gênica relativa. No entanto, a análise deve ser realizada a partir da transformação dos dados para uma escala linear com base na eficiência, assim o erro no resultado final pode ser superestimado no caso de mínima variação nas eficiências individuais. Portanto, os valores de eficiência médias do *amplicon* podem revelar resultados mais próximos aos valores de eficiências individuais, mas com a vantagem na minimização do erro experimental.

3.3.3 Estabilidade de expressão relativa do gene de referência

3.3.3.1 Genes de referência pelo programa geNorm

Pelo método em pares, o gene *InsDeg* apresentou na maior parte das condições os menores valores de estabilidade, principalmente, quando foram consideradas (1) todas as amostras; (2) as amostras não inoculadas (controle); (3) o tecido folha; (4) e o tecido hipocótilo (Figura 3.11). O gene *InsDeg* foi obtido de um estudo para seleção de genes potenciais a normalizadores de soja utilizando a técnica de microarranjo, sendo o homólogo do gene *cons 7* (LIBAULT et al., 2008). Além disso, este gene é uma peptidase, homóloga a enzima da peptidase degradadora de insulina em animais, que em células vegetais teria a função mais relacionada com controle da clivagem de proteínas sinalizadoras contendo prolina como substrato (CUNNINGHAM; O'CONNOR, 1997), sendo assim participante de processos celulares básicos, o que demonstra seu potencial

como gene de referência. Neste trabalho de Libault e colaboradores (2008), onde a soja foi analisada em diversas condições (diferentes tecidos sob estresse biótico e abiótico), o gene homólogo, *cons7* foi também considerado como um dos genes mais estáveis para todos os tratamentos avaliados. Este mesmo gene foi ainda determinado o mais estável e adequado para validação de bibliotecas subtrativas de feijoeiro comum durante interação compatível e incompatível com o fungo *U. appendiculatus* (THIBIVILLIER et al., 2009). A partir destes resultados, este gene demonstra alto potencial como normalizador de expressão gênica em leguminosas.

Assim como o homólogo do gene *InsDeg*, os homólogos de *Ukn1*, *Ukn2* e *Skip16* foram obtidos do estudo de Libault et al. (2008). No entanto, estes genes foram melhores avaliados por Hu e colaboradores (2009), onde foram determinados altos valores de estabilidade destes genes em diversas condições em soja (diferentes tecidos, variedades, fotoperíodo, estágio de desenvolvimento, e comprimento de luz). Neste trabalho pôde ser observado ainda que genes de referências convencionais, tais como os homólogos de *Tub2* (*TUB4*) e *Act2* (*ACT11*), se destacaram em análise de diferentes cultivares, sendo a *ACT11* estável também no estudo de diferentes tecidos e fotoperíodo. Neste presente estudo em feijoeiro, o gene *Tub2* se destacou na condição que incluiu diferentes órgãos, enquanto a *Act2* apresentou maior estabilidade nas folhas. Portanto, o desempenho variado dos genes candidatos em determinadas condições corrobora com a importância de se validar os normalizadores para as condições de interesse.

Como anteriormente relatado, o método em pares, base do programa geNorm, pode ser sensível a genes pertencentes a mesma classe funcional, tendendo a agrupar estes genes nas análises. Neste estudo, este tipo de resultado tendencioso pode ser considerado pouco provável já que em todos os agrupamentos avaliados não foi observado genes relacionados destacando-se como a melhor combinação de genes mais estáveis (Figura 3.10).

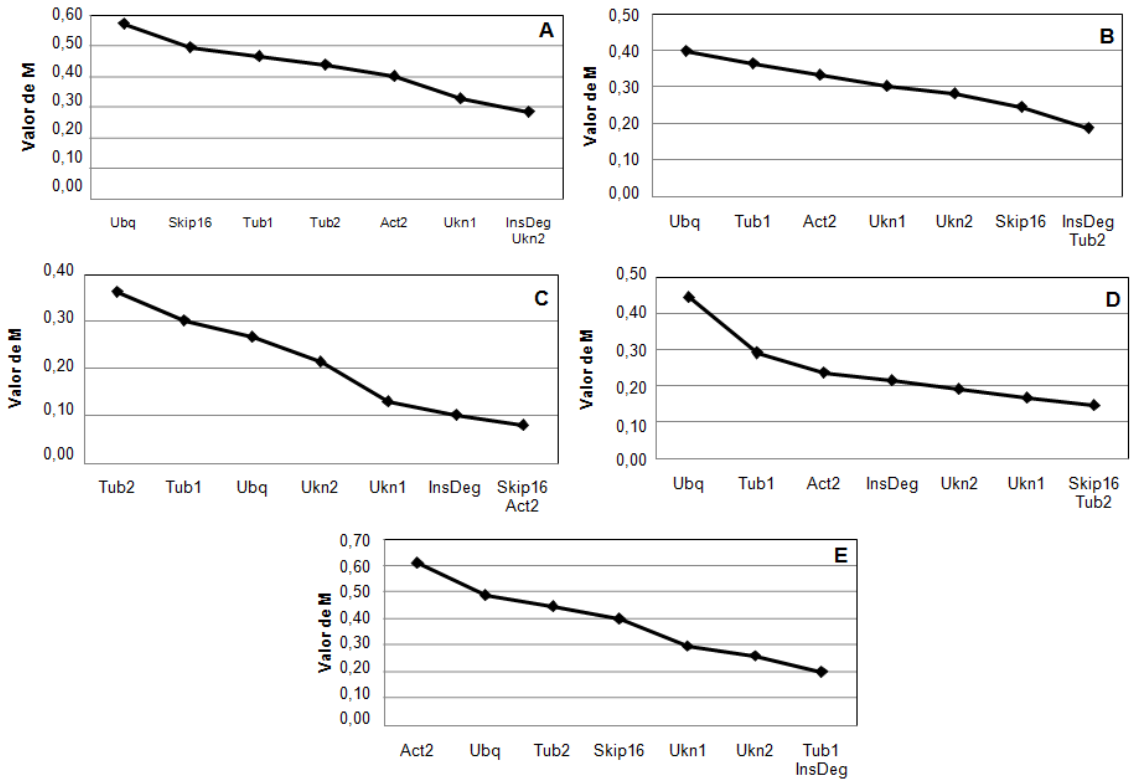
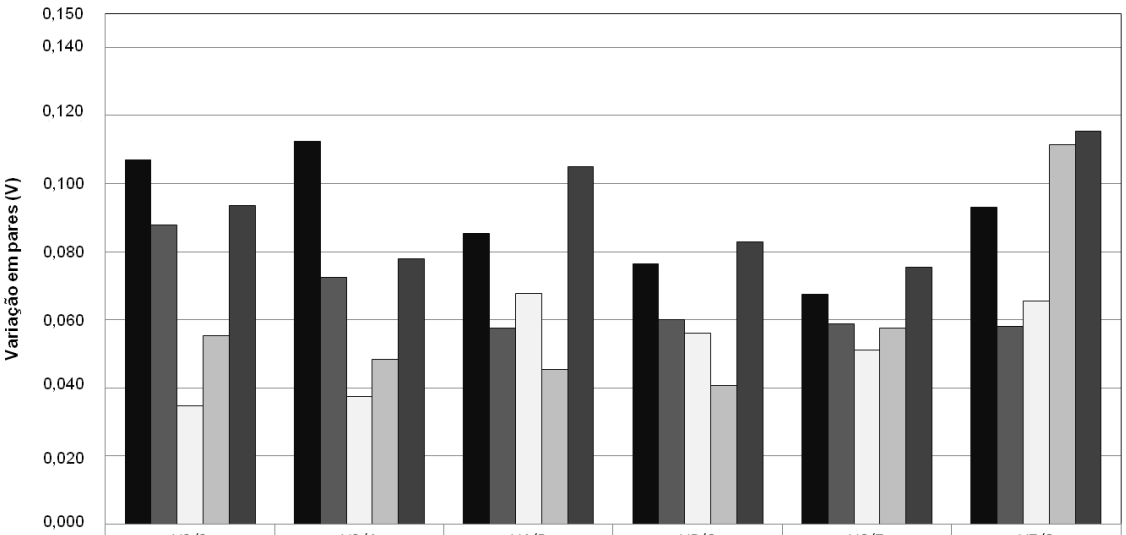


Figura 3.10 - Média da estabilidade da expressão (M) dos oito candidatos a genes de referência. As análises foram feitas considerando todas as amostras (A); Folha, Epicótilo e Hipocótilo controle (B); Folha controle e inoculada (C); Epicótilo controle e inoculado (D); Hipocótilo controle e inoculado (E)

Na análise dos valores médios de variação em pares (V_n/V_{n+1}) deve ser considerado o efeito da adição de outro gene no valor médio de variação, onde a redução significativamente dos valores indica a necessidade de inclusão do gene na análise para obtenção de um fator de normalização confiável. Assim, genes de referência extras podem ser incluídos até que o valor de V_n/V_{n+1} seja menor que um determinado valor limite. Neste caso, foi considerado o valor recomendado por Vandesompele et al. (2002), que estabeleceram valor limite de 0,15. Com base neste parâmetro, os valores encontrados para variação média apresentados por dois genes em relação três genes ($V_{2/3}$) apresentaram para todas as condições, tecidos e tratamentos estudados valores menor que 0,15, possibilitando assim assumir o uso de apenas dois genes de referências para as análises de qPCR em tempo real nas condições estudadas (Figura 3.11). Este resultado demonstra ainda a alta estabilidade dos genes candidatos a normalizadores utilizados no estudo.



	V2/3	V3/4	V4/5	V5/6	V6/7	V7/8
Todas	0,107	0,113	0,085	0,076	0,067	0,093
Tecidos	0,088	0,073	0,058	0,060	0,059	0,058
Folha	0,035	0,037	0,068	0,056	0,051	0,066
Epicótilo	0,055	0,048	0,045	0,041	0,058	0,111
Hipocótilo	0,094	0,078	0,105	0,083	0,075	0,115

Figura 3.11 - Valores médios de variação aos pares, considerando todas as condições; tecidos controle dos órgãos folha, epicótilo e hipocótilo; somente folha inoculada e controle; somente epicótilo inoculado e controle; somente inoculado e controle

3.3.3.2 Genes de referências pelo programa NormFinder

No programa NormFinder pode ser feita análise com todas amostras, ou em cada tratamento, com determinação ou não de grupos. No entanto, o agrupamento das amostras pode ser considerado mais informativo, já que a partir das variações inter e intra-grupos podem ser utilizadas para melhor definir a combinação de genes para cada tipo de estudo desejado. De acordo com esta análise, os melhores genes são caracterizados por apresentar baixos valores de diferença de expressão entre e dentro dos grupos. Na Figura 3.12 foi possível observar maior estabilidade para *InsDeg* e *Act2*, quando comparados quatro grupos: 1) tecidos dos órgãos controle; 2) tratamento 48 hai; e 3) tratamento 96 hai. Assim, como obtido nas análises pelo geNorm, o gene *InsDeg* demonstra novamente potencial como normalizador em estudo de expressão gênica sob diversas condições. Por outro lado, apesar de pertencerem a classes funcionais importantes na célula, os genes *Ubq* e *Tub1* se apresentaram novamente como menos estáveis, assim como nas análises pelo método em pares. Estes genes foram também avaliados por Thibivillier et al. (2009), demonstrando baixos valores de estabilidade durante validação de biblioteca subtrativa de feijoeiro. Estas variações de genes normalmente utilizados como controles internos confirmam a necessidade de validação dos genes de referências nas condições de interesse.

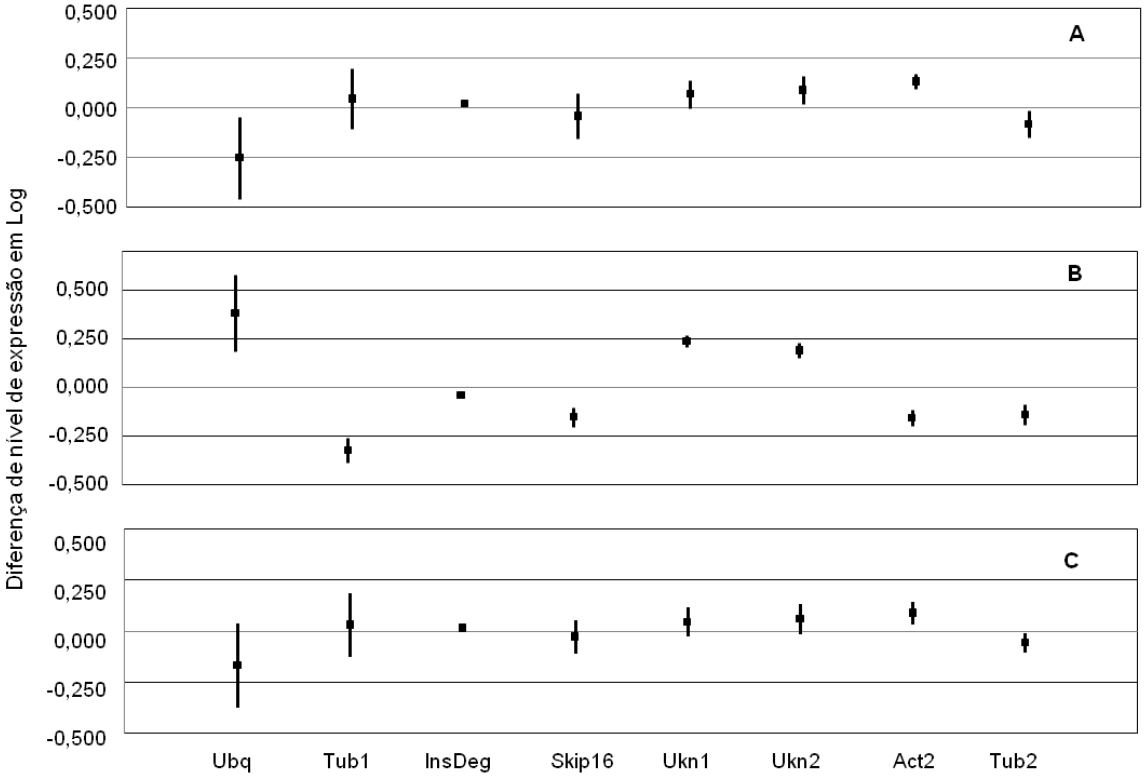


Figura 3.12 - Diferenças de expressão gênica entre os genes candidatos a normalizadores. Os níveis de expressão gênica ou variação inter-grupo (A: Controle|48hai|96hai; B: Folha|Epicótilo|Hipocótilo; C: Controle|Inoculado), considerando todos os órgãos, na escala logarítmica são representados pelos quadrados pretos. As variações intra-grupos são representadas pelas barras verticais, podem ser considerados os intervalos de confiança para as diferenças

A Tabela 3.3 demonstra as posições dos genes mais estáveis para os menos estáveis, além das melhores combinações para cada grupo específico ou combinações de grupos, contendo tecidos ou períodos de inoculação. Pelo posicionamento dos genes nesta tabela, a melhor combinação de *InsDeg* e *Act2* pôde ser determinada, já que estes genes se apresentam bem colocados na maior parte dos agrupamentos, além de serem considerados a melhor combinação considerando todas as amostras, tendo como grupo (1) controle; (2) tratamento 48 hai; (3) tratamento 96 hai. De forma geral, os genes para a *Act2*, *InsDeg*, *Ukn1* e *Ukn2* ficaram entre os melhores posicionados nas diferentes condições avaliadas, indicando um grande potencial destes genes como normalizadores em condições de estresse biótico em feijoeiro comum. A eficiência destes genes como controle interno foram observados por Hu et al. (2009), durante seleção de normalizadores de estudo de expressão diferencial em soja.

Tabela 3.3 - Classificação dos genes candidatos a normalizadores com base nos valores de estabilidade de expressão calculada no NormFinder

Ordem	Controle (F:E:H)	[1]F	[1]E	[1]H	[2]Todas amostras (C:48:96)
1	*InsDeg*	*InsDeg*	*Act2*	*InsDeg*	*InsDeg*
2	*Skip16*	*Ukn1*	*InsDeg*	*Ukn2*	*Act2*
3	*Tub2*	*Act2*	*Ukn1*	*Tub2*	*Ukn2*
4	*Ukn2*	*Skip16*	*Tub2*	*Skip16*	*Ukn1*
5	*Act2*	*Ukn2*	*Ukn2*	*Tub1*	*Tub2*
6	*Ukn1*	*Ubq*	*Tub1*	*Ukn1*	*Skip16*
7	*Ubq*	*Tub1*	*Skip16*	*Ubq*	*Tub1*
8	*Tub1*	*Tub2*	*Ubq*	*Act2*	*Ubq*
Mais estável	*InsDeg*	*InsDeg*	*Act2*	*InsDeg*	*InsDeg*
Valor de estabilidade	0,062	0,037	0,028	0,070	0,042
Melhor combinação	*Ubq e Act2*				*InsDeg e Act2*
Valor de estabilidade	0,056				0,062

[1]Controle e tratamento inoculado em folha (F), epicótilo (E) e hipocótilo (H), sem considerar grupos.
[2]Todas amostras considerando quatro grupos: C: controle; 48 hai; 96 hai.

3.3.4 Expressão relativa do gene *PvPR2*

A relação do *primer* utilizado para amplificação do gene-alvo utilizado na validação dos dados está apresentado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Características do gene alvo utilizado para validação dos genes candidatos a normalizadores

Gene*	ID*	Função	Sequências *Forward*/*Reverse* 5' → 3'	[1]T (pb)	[2]Tm	E[3]
PvPR2	Contig458	*1,3-beta-D-glucanase*	F:AGCAGCTCTGCAAGCACTCA R:ACGAGCAGTGTCGGCATTG	100	81,1	1,922

[1]T: tamanho do *amplicon*; [2]Tm: temperatura de *melting*; [3]E: Eficiência média do *amplicon*; *ID: identificação das sequências em Anexo A.

Na análise da expressão relativa (ER), o gene alvo apresentou expressão gênica diferencial positiva nos tratamentos (Tabela 3.5). O gene codificador da *1,3-beta-D-glucanase* foi obtido de uma biblioteca de EST de feijoeiro comum (MELOTTO et al., 2005), o qual demonstrou número de transcritos do gene predominante no tratamento inoculado com o fungo *C. lindemuthianum*, durante interação incompatível. Genes homólogos a *PvPR2* têm sido relacionado com patossistemas incluindo plantas e fungo. Este gene tem função de atuar diretamente na parede celular do patógeno na tentativa de interagir com as poliendoglucanas, resultando na instabilidade da parede do patógeno

evitando assim seu crescimento. Portanto, o gene para a *1,3-beta-D-glucanase* pode ser considerado um gene de resposta rápida, participante do mecanismo de defesa direta da planta sobre o agente patogênico (FERREIRA et al., 2007). Com o conhecimento do gene era esperada alta expressão gênica relativa em nas condições de interação compatível entre o *P. vulgaris* e *C. lindemuthianum*.

Tabela 3.5 - Relação dos valores de expressão gênica relativa (ER) de *PvPR2*, assim como erro padrão (SE) e nível de significância (*p*) em folha de feijoeiro durante interação incompatível com *C. lindemuthianum* por 48 e 96 horas após inoculação. Os genes candidatos a normalizadores foram utilizados de forma individual e combinada como definido nos programas geNorm e NormFinder

Normalizador	**48 HAI**			**96HAI**		
	ER	**SE**	***p***	**ER**	**SE**	***p***
Ubq	1,159	0,141	0,788	4,403	0,285	0,077
Tub1	1,284	0,135	0,499	5,732	0,745	0,036
InsDeg	1,869	0,201	0,001	5,383	0,288	0,036
Skip16	1,831	0,279	0,001	5,116	0,819	0,036
Ukn1	1,996	0,253	0,001	6,543	0,438	0,036
Ukn2	2,022	0,423	0,001	6,065	1,034	0,036
Act2	1,738	0,272	0,042	5,548	0,401	0,036
Tub2	2,069	0,228	0,001	6,744	0,535	0,036
[1]***InsDeg|Act2***	1,802	0,194	0,001	5,465	0,293	0,036
[2]***InsDeg|Ukn2***	1,944	0,209	0,001	5,714	0,306	0,036

[1]melhor combinação para todos as amostras pelo NormFinder.
[2]melhor combinação para todas as amostras pelo geNorm.

Como verificado pelos resultados dos programas geNorm e NormFinder para as condições de estresse biótico, os genes *Ubq* e *Tub1* revelam baixa estabilidade (Tabela 3.5). Estes genes apresentaram valores pouco significativos de ER do gene alvo, quando utilizados como normalizadores em tratamento 48 hai e alto valor de erro padrão do gene *Tub1* em tratamento 96 hai. No entanto, os demais genes candidatos levaram a observação de valores de expressão diferencial positiva e significativa ($p<0,05$) para o gene da *1,3-beta-D-glucanase* nos tratamentos inoculados 48 e 96 hai. Para as melhores combinações de genes normalizadores todos apresentaram significativa expressão diferencial positiva ($p<0,05$), com valor no tratamento 48 hai e em nível de 5% no tratamento 96 hai, sendo que a combinação de *InsDeg* e *Act2*, pode ser destacada por apresentar menor valor de erro padrão. Além disso, baixos valores de erro padrão foram observados para estes genes quando utilizados individualmente como gene de referência.

Portanto, a combinação de *InsDeg* e *Act2* pode ser recomendada para estudo de expressão gênica durante estudos de estresse biótico em feijoeiro comum.

3. 4 CONCLUSÕES

Diferentes combinações de genes de referência foram sugeridas para cada condição experimental para estresse biótico avaliado. No entanto, considerando todas as amostras e tratamentos, os genes *InsDeg* e *Act2* podem ser indicados para as análises envolvendo o feijoeiro sob estresse biótico. Normalizadores em potencial foram determinados, entretanto, as análises para cada condição devem ser realizadas, já que a expressão gênica pode apresentar consideráveis variações experimentais e tecido-específicas. Os dados obtidos neste trabalho podem contribuir para o aumento no número de genes de referência disponíveis úteis na normalização da expressão de genes de feijoeiro comum pelo método RT-qPCR.

REFERÊNCIAS

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

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

BERALDO, A.L.A. **Utilização de SCARs para avaliação de genes de resistência à antracnose em feijoeiro**, 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, p. 169-193, 2000.

_____, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 29, p. 29-39, 2002.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 611-622, 2009.

CORDOBA, E.M.; DIE, J.V.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I.; NADAL, S.; ROMÁN, B. Selection of reference genes in *Hedysarum coronarium* under various stresses and stages of development. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 409, p. 236–243, 2011.

CUNNINGHAM, D.F.; O'CONNOR, B. Proline-specific peptidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Armsterdam, v. 1343, p. 160-186, 1997.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 5-17, 2005.

DOYLE, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Boston, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis, **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 8, p. 677-700, 2007.

GEPTS, P.; ARAGÃO F.J.L.; De BARROS E.; BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.J.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; McCLEAN P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.;

PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical**: crop plants. Berlin:Springer, 2008. v. 1, p. 113-143.

HU, R.; FAN, C.; LI, H.; ZHANG, Q.; FU, Y.F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, p. 93-104, 2009.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 345, p. 646-651, 2006.

LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D.D.; RADWAN, O.; BENITEZ, M.; CLOUGH, S.J.; STACEY, G. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, Madison, v. 1, p. 44-54, 2008.

LOVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress, **Analytical Biochemistry**, New York, v. 387, p. 238–242, 2009.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the Co-1 locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 143-149, 2000.

_____. Fine mapping of the *Co-4* locus of common bean reveals a resistance gene candidate, *COK-4*, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 508-517, 2001.

MELOTTO, M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BRUSCHI, A.G.; CAMARGO, L.E. Comparative bioinformatic analisys of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome**, Ottawa, v. 48, p. 562-570, 2005.

PAOLACCI, A.R.; TANZARELLA, O.A.; PORCEDDU, E.; CIAFFI, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, p. 11, 2009.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, e36, 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 13, p. 62-66, 2003.

RUIJTER, J.M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W.M.H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; van DEN HOFF, M.J.B.; MOORMAN, A.F.M. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, e45, 2009.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; De BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T., IGOUT, E.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 291-295, 1999.

THIBIVILLIERS, S.; JOSHI, T.; CAMPBELL, K.; SCHEFFLER, B.; XU, D.; COOPER, B.; NGUYEN, H.; STACEY, G. Generation of *Phaseolus vulgaris* ESTs and investigation of their regulation upon Uromyces appendiculatus infection. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 46, 2009.

TRICARICO, C.; PINZANI, P.; BIANCHI, S.; PAGLIERANI, M.; DISTANTE, V.; PAZZAGLI, M.; BUSTIN, S.A.; ORLANDO C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 309, p. 293-300, 2002.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; van ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034.1- RESEARCH0034.11, 2002.

YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic resistance in the differential cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 87-94, 1998.

4 VALIDAÇÃO DE BIBLIOTECAS DE ESTS OBTIDAS DE INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL DO FEIJOEIRO COMUM E *C. lindemuthianum*

RESUMO

Bibliotecas de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) geram informações importantes para o melhor conhecimento sobre mecanismos de resposta gênica a condições específicas em espécies animais e vegetais. Apesar da eficiente resolução qualitativa da técnica, esta possui limitações no que se relaciona a quantificar os genes identificados como diferencialmente expressos em determinados tratamentos. Assim, oito genes foram analisados pelo método quantitativo RT-PCR durante interação incompatível entre a variedade de feijoeiro comum SEL 1308 e o fungo patogênico da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, visando a validação do perfil transcricional das bibliotecas de ESTs pré-definidas (MELOTTO et al. 2005) obtidas da mesma interação de incompatibilidade. Precedendo esta etapa, genes de referências foram determinados para a condição experimental do estudo visando à melhor normalização dos dados de quantificação relativa pelo método de RT-qPCR. A eficiência das curvas de amplificação (E) e ciclo de quantificação (Cq) foram determinados usando o programa LinRegPCR. Os valores de estabilidade dos possíveis genes de referência foram obtidos a partir dos programas geNorm e NormFinder enquanto as análises estatísticas e normalização e os valores de expressão diferencial dos oito genes alvos foram definidos pelo programa REST. Os genes *Act1* (*actina*) e *Ukn2* (*desconhecido*) foram considerados a melhor combinação de genes de referência na condição avaliada. Sete genes apresentaram mesmo perfil de expressão diferencial das bibliotecas de ESTs. Assim, a validação das bibliotecas de ESTs foi realizada, sendo possível suportar os dados quantitativos dos demais genes obtidos pelo método de clonagem de sequências expressas.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Bibliotecas de ESTs. Antracnose; RT-qPCR.

ABSTRACT

Expressed Sequences Tags (ESTs) libraries contribute to increase information about responsive mechanisms during specific conditions in plant and animal species. Besides the efficient qualitative resolution of this technique, it has limitations in respect to quantitative analysis of differential gene expression. Then, eight genes were analyzed by quantitative RT-PCR method during incompatible interaction between the common bean SEL 1308 and the pathogen fungus *Colletotrichum lindemuthianum* race 73 to validate the previously determined ESTs libraries (MELOTTO et al. 2005) obtained from the same incompatibility interaction. Before this stage, reference genes were determined to this experimental condition to normalize the real time PCR data. The efficiency of amplification curves (E) and quantification cycles (Cq) were determined using LinRegPCR software. The stabilitie values of putative reference genes were obtained by geNorm and NormFinder while the statistic analysis and normalization and relative quantification of eight target genes were defined by REST software. The *Act1* (*actin*) and *Ukn2* (*unknown*) were considered the best combination of reference genes in the evaluated condition. Seven genes presented the same differential expression profile of the ESTs libraries. Then, the validation of ESTs libraries was done, which supports the quantitative data of other genes obtained by the cloning method of expressed sequences.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. ESTs libraries. Anthracnose; RT-qPCR.

4.1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma fonte alimentar importante para populações humanas. No entanto, a produção desta cultura tem sido constantemente afetada por ataque de patógenos, dentre os quais pode ser destacado o fungo causador da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (PASTOR-CORRALES; TU, 1989). O desenvolvimento de plantas resistentes tem sido importante no controle da antracnose, sendo assim fundamental o maior conhecimento dos mecanismos envolvidos nas respostas de incompatibilidade (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994; JIA et al., 2000).

Bibliotecas de etiquets de sequências expressas ou e*xpressed sequence tags* (ESTs) se caracterizam pela rapidez e grande quantidade de segmentos curtos obtidos pelo sequenciamento parcial de clones de cDNA. Em adição, a obtenção destas bibliotecas se destaca como um método importante na geração de informações sobre expressão diferencial de transcritos em plantas e animais (OKUBO et al., 1998). Na análise dos dados obtidos por esta técnica são relacionados os níveis de expressão gênica com a estimativa de abundância de RNA mensageiro (RNAm) encontrado numa determinada população original (OHLROGGE; BENNINGT, 2000). No entanto, limitações do método de clonagem, úteil na obtenção das bibliotecas de ESTs, podem comprometer a confiabilidade dos resultados quantitativos, o que requer validação dos dados por métodos mais acurados, tal como a técnica da transcrição reversa PCR quantitativo (RT-qPCR).

O método RT-qPCR tem como base a transcrição reversa de moléculas de RNA mensageiro da amostra e, consequente detecção, a cada ciclo, dos níveis de fluorescência durante ciclos de amplificações das sequências alvos. Este método tem sido amplamente aplicado em diversos estudos de genômica funcional, incluindo as áreas de medicina molecular, virologia, microbiologia e biotecnologia, devido à relativa rapidez de execução, precisão e acurácia dos dados qualitativos e quantitativos gerados (BUSTIN, 2009).

No presente estudo os níveis de expressão de oito genes pré-definidos foram analisados a partir da técnica de RT-qPCR em tempo real para validação dos valores de expressão diferencial dos transcritos encontrados nas bibliotecas de ESTs desenvolvidas

por Melotto et al. (2005). Estas foram obtidas a partir de plântulas de uma linhagem resistente à antracnose (SEL 1308) controle e inoculada com a raça 73 do fungo *C. lindemuthianum* com interação de 65 horas após inoculação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

A inoculação e a coleta de material vegetal foram realizadas no laboratório de Biologia Celular e Molecular, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA - USP), Piracicaba, SP. O agente patogênico foi cedido pela Dra. Adriane Wendland da EMBRAPA arroz e feijão (Goiânia – GO) e enviado ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do IAC (Campinas – SP) para cultivo e preparação dos inóculos da raça 73 do fungo *C. lindemuthianum*. No Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Grãos e Fibras do IAC (Campinas – SP) foi realizada ainda a verificação da raça do patógeno.

4.2.1 Material Biológico

4.2.1.1 Material vegetal

Foi utilizado o feijoeiro SEL 1308 de *P. vulgaris*, obtido pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia). Este se caracteriza pela resistência a 97% de todas as raças de *C. lindemuthianum* que causam antracnose no feijoeiro comum. Como controle positivo, foi utilizada a variedade de feijoeiro suscetível a raça do patógeno utilizada (Black Magic).

As sementes de feijão foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 10% (v/v) durante 10 min, lavadas em água esterilizada e colocadas para germinar em papel filtro no escuro e temperatura ambiente (± 25°C) por quatro dias. Em seguida, plântulas foram transferidas para vasos com substrato comercial, constituindo-se assim 3 plântulas por vaso, sendo 2 vasos reservados para cada período no tratamento inoculado [65 horas após inoculação (hai)] e não inoculado (65 horas), resultando num total de 4 vasos de SEL

1308. Foi mantido nas mesmas condições um vaso da variedade suscetível (3 plântulas) inoculada para verificar os sintomas após 7 dias de interação com o patógeno.

4.2.1.2 Preparo do inóculo do patógeno e inoculação das plântulas

O preparo do patógeno a partir de tecido vegetal em meio de cultura Mathur e o método de inoculação foi realizado como definido por Melloto; Kelly (2000). Assim, no tratamento inoculado, a solução de concentração de 1,0 x 10^6 esporos/ml de inóculo foi aplicada em plântulas de 10 dias.

Em seguida, os vasos com as plantas inoculadas e não inoculadas, foram embalados com plástico translúcido, mantendo assim o acesso a luz e umidade necessária (± 100%). Os vasos foram ainda mantidos em sala com temperatura e fotoperíodo controlado (± 22°C e 16h de luz: 8h de escuro) para possibilitar as melhores condições ao desenvolvimento do fungo (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Inoculação do patógeno e manutenção dos tratamentos resistente e suscetível inoculado e não inoculado mantidos sob condição de alta umidade, fotoperíodo e temperatura controlada

4.2.2 Coleta do material vegetal

Para cada tratamento foi obtido um *bulk* de tecido da parte aérea da linhagem resistente SEL 1308. Para tratamento e controle, cinco plântulas foram utilizadas para obtenção de dois conjuntos ou *bulks* de partes aéreas (*bulk* controle e *bulk* tratamento 65

hai) (Figura 4.2). O material vegetal foi coletado, embalado em papel alumínio e, prontamente, congelado com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo, posteriormente, armazenado a -80°C. Este mesmo experimento foi repetido três vezes.

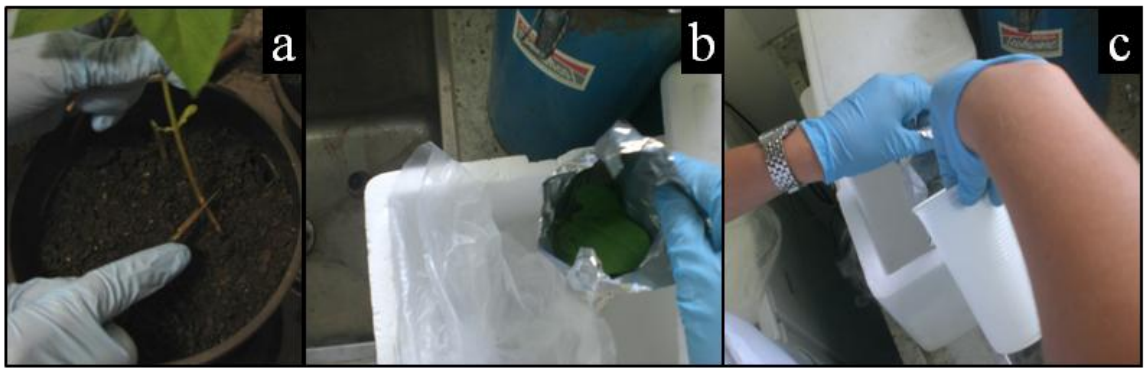


Figura 4.2 – Coleta da parte aérea das plântulas (a), armazenamento em papel alumínio (b) e posterior congelamento por nitrogênio líquido (c)

4.2.3 Seleção dos gene-alvo para as análises de RT-qPCR

Para validação, oito genes foram selecionados com base na expressão gênica diferencial nas bibliotecas de ESTs obtidas por Melotto e colaboradores (2005) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Relação dos oito genes-alvo utilizados no estudo, com os números absolutos e percentuais dos ESTs observados nas bibliotecas controle e inoculada

Gene	**ID***	**Função**	**N° de EST (controle)**	**%ESTs[1] (controle)**	**N°ESTs (inoculado)**	**%ESTs[1] (inoculado)**
PvPR1a	PVEPSE3029H20.g	*PR1-like protein*	0	0,000	1	0,043
PvPR1b	Contig186	*Pathogenesis related protein-1*	1	0,034	4	0,172
PvPR2	Contig458	*1,3-beta-D-glucanase*	1	0,034	4	0,172
PvPGIb	Contig413	*Proteína rica em repeticões de leucina*	3	0,103	0	0,000
PvPR16a	Contig199	*Germin-like protein 8*	2	0,068	0	0,000
PvPR16b	Contig202	*Germin-like protein 10*	2	0,068	0	0,000
PvPAL	Contig535	*Phenylalanine ammonia-lyase 2*	0	0,000	3	0,086
PvCNC	Contig435	*Cyclic nucleotide-gated ion channel 2*	0	0,000	3	0,123

[1] Percentagem de ESTs de cada gene em relação ao número de ESTs totais da biblioteca controle (2.923 ESTs) e inoculada (2332 ESTs).
*ID: Identificação das sequências no Anexo A.

4.2.4 Desenho dos *primers*

Para desenho dos *primers* foi utilizado o programa *PRIMER* 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) considerando os seguintes parâmetros: a) tamanho do produto: 100 – 200 pb; b) tamanho do *primer*: 18 – 22 pb; 3) temperatura de *melting*: 57 – 63°C; 4) quantidade de GC: 40 – 60%. A qualidade dos *primer*s foi analisada a partir da ferramenta *Oligo Analysis* (www.operon.com), a fim de evitar a formação de estruturas secundárias. O DNA e cDNA de SEL 1308 controle (não inoculado) foram utilizados para teste dos *primer*s. O primeiro foi obtido pelo protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), sendo o cDNA obtido a partir do kit SuperScrit RT-PCR (invitrogen). Para uso da fita de DNA/cDNA como molde, cada reação de amplificação com volume final de 25 µL constituiu de tampão 1X, 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de *primers Reverse*/*Forward*, 20 ng de DNA/cDNA e 5 U de *Taq* DNA Polimerase *Platinum*. As condições de amplificação foram conduzidas da seguinte forma: um ciclo por 10 min a 94°C para ativação da enzima *Taq* DNA polimerase e desnaturação das moléculas; 40 ciclos para amplificação do DNA/cDNA de 30 s a 94°C para desnaturação, 30 s a 55°C para anelamento de *primers* e 1 min a 72°C para extensão dos fragmentos; e um ciclo final de 7 min a 72°C para extensão final dos fragmentos. A qualidade dos produtos de amplificação foi observada separando os produtos de amplificação ao sistema eletroforético em gel de agarose 2%.

4.2.5 Extração do RNA total

Para cada tratamento, o material vegetal foi submetido ao kit reagente TRIzol (Invitrogen) modificado, sendo o procedimento realizado como descrito abaixo: A análise de qualidade e quantificação do RNA total isolado foi realizada a partir do espectrofotômetro (NanoDrop 2000c), considerando uma relação ideal de comprimento de onda ($1,8 \leq A_{260/280} \leq 2,0$), e da visualização dos padrões de bandas do RNA total que foi realizada em gel de agarose 1,5%. Em adição, para garantir a purificação do RNA foi realizado o tratamento com DNAse, a partir do kit da DNAse1, RNAse-Free (Fermentas).

4.2.6 Curva de amplificação

Para melhor precisão dos dados, a amplificação dos genes candidatos nos tratamentos controle e inoculado foi realizada numa mesma placa de qPCR. A reação de amplificação destes genes e análise do gene alvo foram realizados no equipamento Applied Biosystem StepOnePlus™ Real Time PCR em um único passo usando 100 ng de RNA total, 250 pmol de cada *primer* (*Forward*/ *Reverse*) e kit 2X Sensimix™ SYBR & ROX one-Step (Peqlab). As condições de amplificação foram realizadas num volume final de 10 µL compreendendo um ciclo por 10 min a 42°C para síntese de cDNA e 10 min a 95°C para desnaturação da transcriptase reversa e ativação da *Taq* DNA polimerase; 40 ciclos de amplificação do cDNA de 15 s a 95°C para desnaturação das moléculas, 30 s a 60°C para anelamento do *primers*, 30 s a 72°C para extensão final do produto e captação do sinal de fluorescência pelo equipamento. A etapa final compreende a curva de dissociação dos produtos que inclui um ciclo final de 15 s a 95°C para desnaturação e medida da fluorescência a cada variação de 0,7°C, com temperatura inicial 60°C e final 95°C. Para cada condição, três replicatas experimentais foram utilizadas.

4.2.7 Análise dos dados

O desenho esquemático dos procedimentos para análise dos dados é representado pela Figura 4.3.

Os dados brutos (dados sem correção da linha de base) dos níveis de fluorescências foram submetidas ao programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), foram obtidos o valor do *threshold*, o ciclo de quantificação (C_q), além de uma reta cuja inclinação é utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação em cada curva ($E = 10^{slope}$). Valores ideais de E ($1.8 \leq E \leq 2$) e correlação ($R \geq 0.995$) foram considerados.

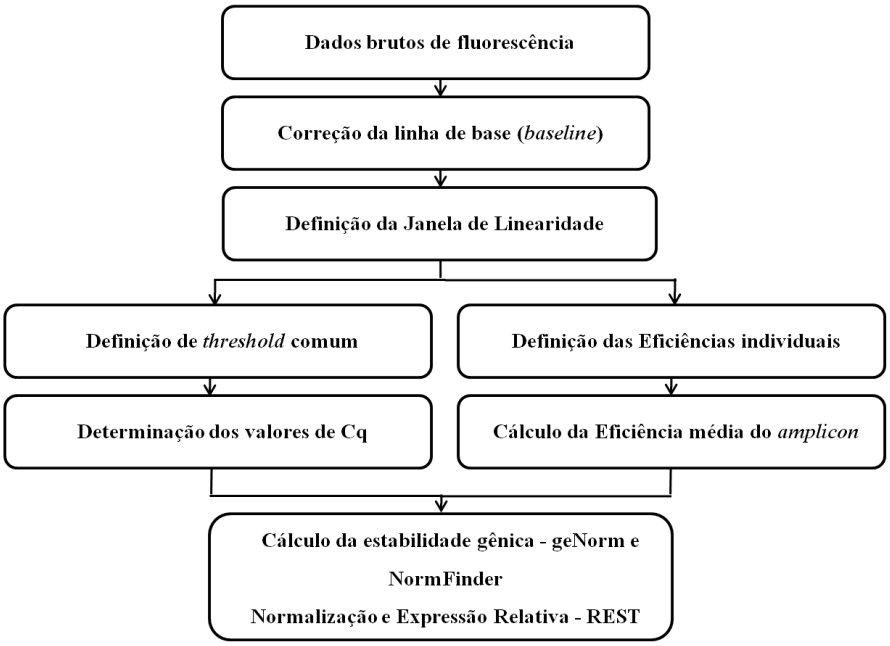


Figura 4.3 – Etapas realizadas para cálculo da eficiência de amplificação e ciclo de quantificação (Cq) no LinRegPCR para análise estatística nos programas geNorm, Normfinder e REST

4.2.8 Análise dos genes de referência e genes-alvo

Para analisar os candicatos a genes de referência nas condições de específicas utilizadas na obtenção das bibliotecas de ESTs, foi realizada uma rápida análise de estabilidade dos genes em tecidos da parte aérea do feijoeiro. Para isso, os dados linearizados obtidos a partir do método Cq foram analisados pelos programas geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) para obtenção dos melhores normalizadores dos dados nas condições estudadas. No programa geNorm foi obtida a medida de estabilidade dos níveis de expressão dos gene analisados (valor de *M*). Para a obtenção do número ideal de genes candidatos, foi obtido ainda a estimativa do fator de normalização (NF_n), sendo possível o cálculo da variação em pares (V_n/V_{n+1}) entre os dois fatores de normalização sequenciais NF_n e NF_{n+1} contendo um número aumentado de genes a cada comparação (VANDESOMPLE et al., 2002).

Os valores de expressão relativa dos genes-alvo normalizados com os respectivos controles internos selecionados e os testes estatísticos foram obtidos no programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002). Neste caso, a expressão gênica relativa do gene-alvo é obtida com base nas eficiências médias

das curvas de amplificações de cada *amplicon*; nas diferenças entre valores de Cq da amostra controle e tratamento (ΔCP). No modelo matemático descrito abaixo (eq. 4.1) a expressão gênica do alvo é normalizada pelo gene de referência (controle interno). O programa REST realiza ainda a comparação entre os valores de Cq do controle e tratamento (amostra) a partir de um teste de realocação fixa aos pares (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*) para definir a significância entre as diferenças de expressão dos genes, com *bootstrap* = 2000 permutações (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002).

Equação 4.1: Expressão relativa (ER) = $(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo(controle-amostra)}}}/(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref(controle-amostra)}}}$

Os testes de aleatorização ou permutação são importantes pela vantagem de não ser necessária a atribuição de normalidade para os dados. Isto porque as quantidades de interesse derivadas de valores relativos e variâncias podem ser elevadas, o que pode afetar a distribuição dos dados, dificultando a aplicação de testes paramétricos (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Especidade dos *primer*s para RT-qPCR

A alta especificidade dos *primers* das oito sequências gênicas (Tabela 4.5) utilizadas na validação das bibliotecas de ESTs foi verificada através da visualização de uma única banda no gel com o tamanho esperado correspondendo ao tamanho das bandas observadas (Figura 4.4). A formação de apenas um pico na análise das curvas de *melting* também corrobora com a alta especificidade dos *primers* (Figura 4.5).

Tabela 4.2– Relação dos *primers* utilizados na amplificação das sequências gênicas para validação das bibliotecas de ESTs pela análise de RT-qPCR

Gene	**Sequência *Forward/ Reverse* 5' → 3'**	**T[1] (pb)**	**Tm[2]**
PvPR1a	F:AAGGAGATGCTCCACCCAATG R:CAGGGATTGGCCAGAAGGTA	100	80.8
PvPR1b	F:ACCAATTAGATGGGATGCAACAGT R:CCCATAAGGACCCCCAGAGT	100	77.3
PvPR2	F:AGCAGCTCTGCAAGCACTCA R:ACGAGCAGTGTCGGCATTG	100	81.1
PvPGIb	F:AAGACAAATCCAAAGCCATGAAA R:GGCGGAATGGGTATTTTGAA	100	79.4
PvPR16a	F:GCAGACCTCAAAAGTGCAGATG R:CAGCTTCAGATAAGCCAGCAAA	100	81.5
PvPR16b	F:AGAGGGTCAAATCTGTGCTGGAT R:CAACAAGCCCTGAGGGAACA	100	79.4
PvPAL	F:ATGGTGCTCCTCTTCCAATTTG R:TGATTTGCCACAGGCTTACAGA	120	75.6
PvCNC	F:CATAAAGCGCAGCCAAAGTCT R:GCGAAGGCACCATGAAAGTAG	100	81.1

[1]T: Tamanho do *amplicon*; [2]Tm: Temperatura de *melting* em °C

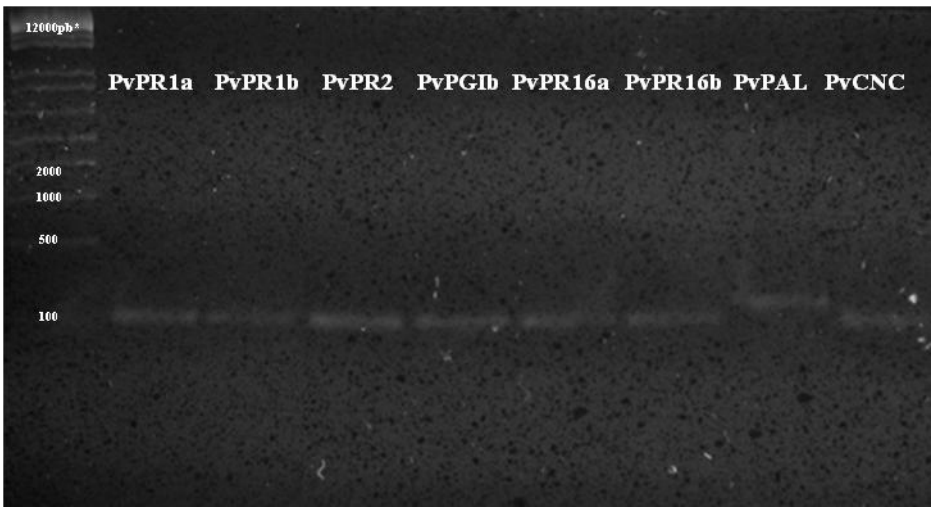


Figura 4.4 – Produtos de PCRo amplificados a partir de DNA de SEL 1308 e pares de *primers* desenhados para os oito genes-alvo selecionados para validação das bibliotecas de *P. vulgaris*

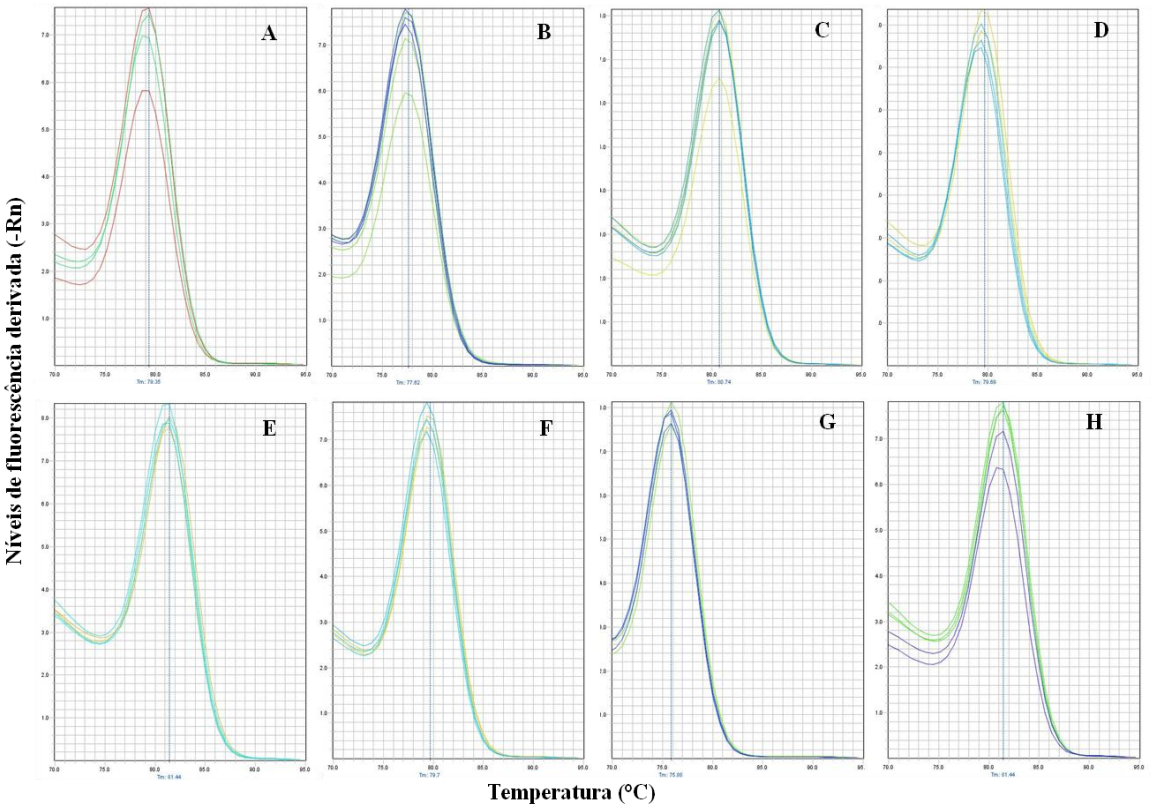


Figura 4.5 – Curva de dissociação a partir de RT-PCR quantitativo dos oito genes (A: *PvPR1a*; B: *PvPR1b*; C: *PvPR2*; D: *PvPGIb*; E: *PvPR16a*; F: *PvPR16b*; G: *PvPAL*; H: *PvCNC*) utilizados para validação das bibliotecas de ESTs em gel de agarose 2%

4.3.2 Genes de referência e validação das bibliotecas de ESTs

Os resultados gerados pelos programas geNorm e NormFinder classificaram os genes *Act2*, *Ukn2* como aqueles de alta estabilidade de expressão gênica durante interação de incompatibilidade envolvendo a parte aérea de feijoeiro comum e o patógeno da antracnose (Figura 4.6 e Tabela 4.3).

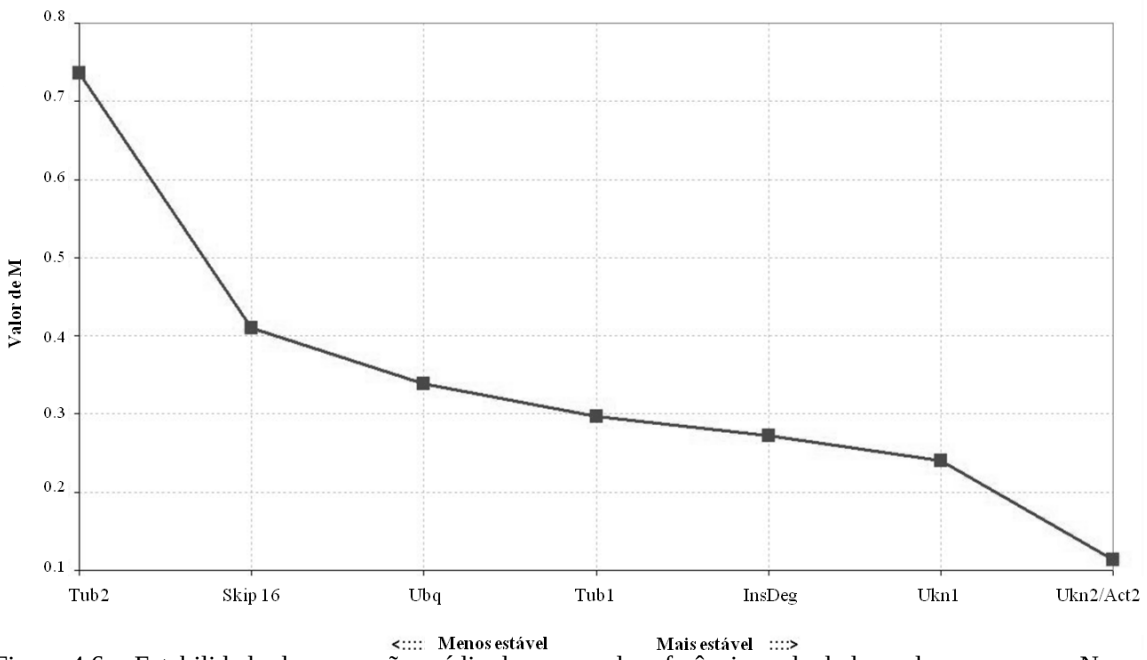


Figura 4.6 – Estabilidade da expressão média dos genes de referências calculados pelo programa geNorm. O gráfico mostra o posicionamento dos oito genes candidatos do menos estável para o mais estável

Tabela 4.3 – Classificação dos candidatos a genes de referência a partir dos cálculos no programa NormFinder considerando o tratamento controle e tratamento 65 horas após inoculação

Classificação	Genes candidatos	Valor de estabilidade
1	*Act2*	0,022
2	*Ukn2*	0,023
3	*InsDeg*	0,078
4	*Ukn1*	0,098
5	*Tub1*	0,116
6	*Ubq*	0,164
7	*Skip16*	0,264
8	*Tub2*	0,753
	Melhor combinação de dois genes	
	Ukn2 e Act2	0,016

Dois genes foram considerados o como número de genes de referência suficiente para normalização das análises de RT-qPCR na condição estudada, considerando o valor limite de V_n/V_{n+1} = 0,15 recomendado por Vandesompele et al. (2002) (Figura 4.7). Assim, os genes *Act2* e *Ukn2* foram considerados os controles internos ideais para normalização dos dados quantitativos obtidos pelo método RT-PCR em tempo real durante interação incompatível feijoeiro comum e *C. lindemuthianum* no tempo de 65 horas após inoculação.

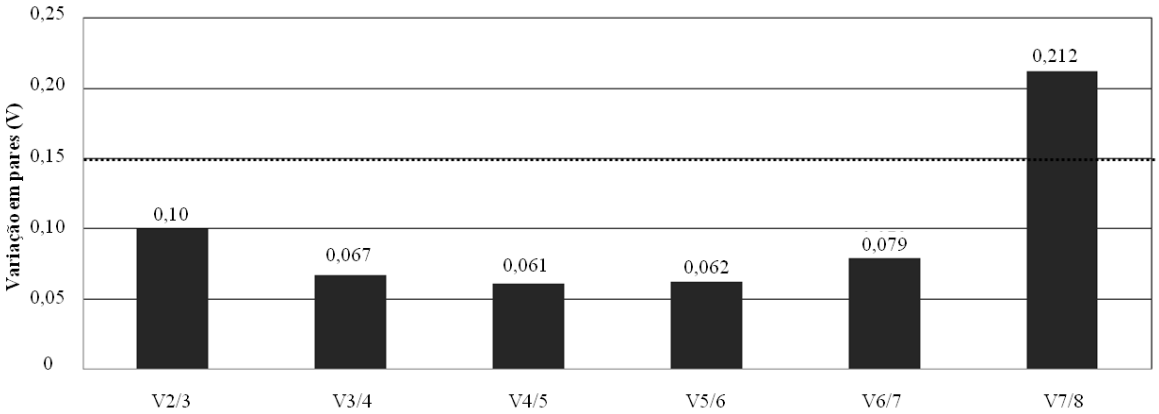


Figura 4.7 – Valores médios de variação nos níveis de expressão aos pares considerando o tratamento controle e tratamento 65 horas após inoculação

A análise comparativa entre o valor percentual de cada EST nas bibliotecas controle e inoculada (Figure 4.8) e a expressão relativa destes genes, a partir da técnica de RT-qPCR, permitiu a validação das bibliotecas de ESTs desenvolvidas por Melotto et al., 2005. Como observado nas bibliotecas de ESTs, os genes relacionados a patogênese (*PvPR1a* e *PvPR1b*) e *1,3-beta-D-glucanase* (*PvPR2*) demonstraram alto nível de expressão gênica no tratamento inoculado. Estes resultados concordam com o fato de que as famílias de proteínas relacionadas à patogênese têm sido relacionadas com a atuação em diferentes patossistemas (MITSUHARA et al., 2008). Os genes que codificam as proteínas PR1 são geralmente usados como marcadores do mecanismo de resistência sistêmica adquirida (RSA), no entanto seu papel funcional permanece desconhecido (van LOON et al., 2006). Os genes para as *1,3-beta-D-glucanase* podem contribuir para a resposta de defesa de forma direta e indireta, os quais podem resultar da degradação da parede celular do patógeno e liberação de oligassacarídeos, que podem servir como elicitores (FERREIRA et al., 2007).

Os demais genes também estão de acordo com os resultados das bibliotecas de ESTs, *PvCNC* e *PvPAL* mostraram regulação gênica diferencial positiva no tratamento em relação ao controle, enquanto *PvPGIb* e *PvPR16a* apresentaram regulação gênica diferencial negativa. *PvPR16b* apresentou menor nível de expressão gênica no tratamento inoculado, no entanto este valor não foi estatisticamente significativo (p<0,841). Diferenças no perfil de expressão entre os valores obtidos de bibliotecas de ESTs e quantificação pela técnica de tempo real podem ser esperadas devido à maior precisão e sensibilidade dos dados gerados por pelo PCR quantitativo.

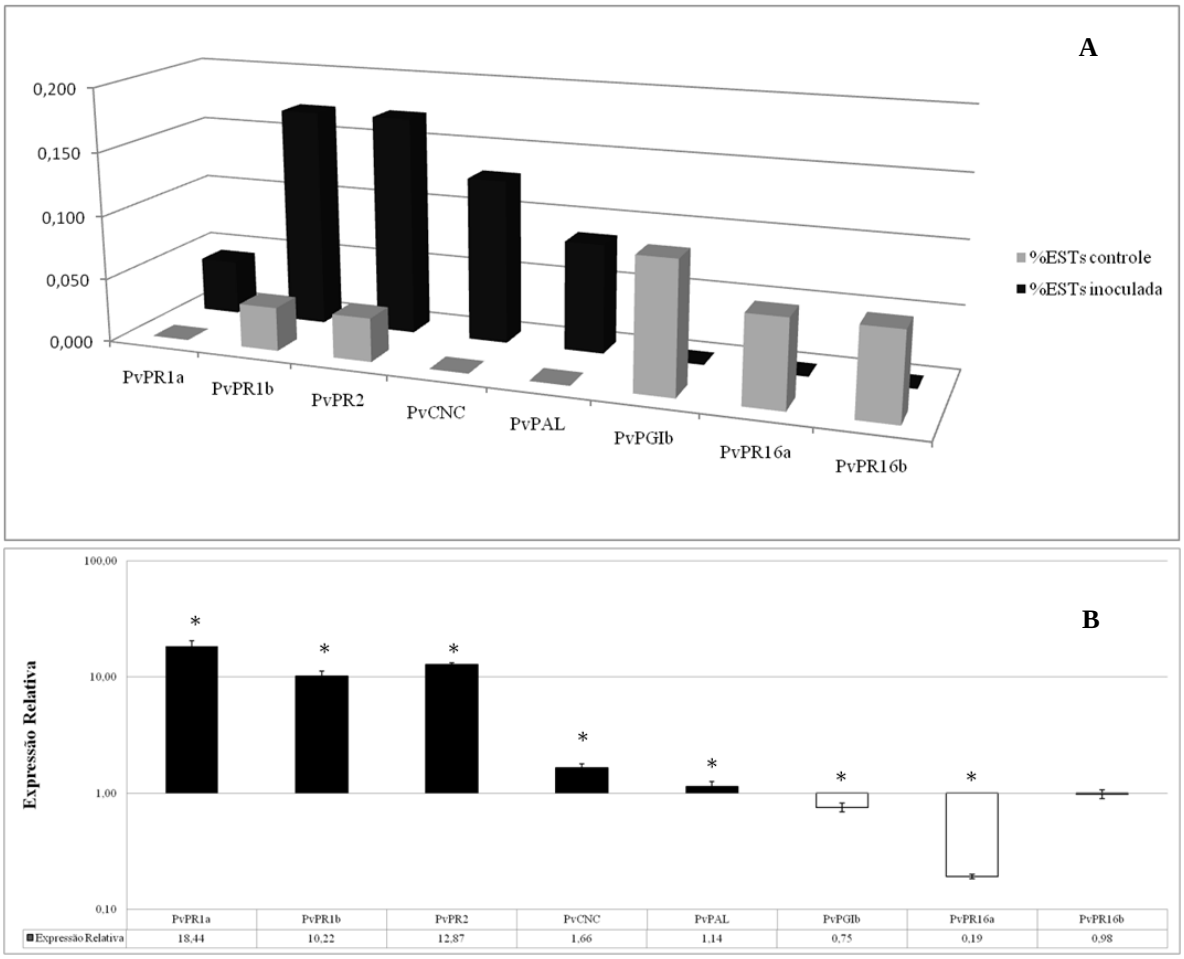


Figura 4.8 – Análise comparativa da expressão dos oito genes a partir das bibliotecas de ESTs e método de RT-qPCR. (A) Porcentagem de cada EST em relação ao número total de ESTs nas bibliotecas controle e inoculada. (B) Expressão gênica relativa na análise quantitativa. *$p<0,005$. Na análise por RT-qPCR, os genes *Act2* e *Ukn2* foram utilizados como os controles internos

4.4. Conclusão

O perfil transcricional observado nas bibliotecas de ESTs de feijoeiro obtidos da interação incompatível entre a linhagem SEL 1308 e raça 73 do patógeno da antracnose *C. lindemuthianum* foi validado pela técnica de RT-qPCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 611-622, 2009.

DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Boston, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C.N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. The role of plant defenceproteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 8, p. 677-700, 2007.

JIA, Y.; MACADAMS, S.A.; BRIAN, G.T.; HERSHEY, H.P.; VALENT, B. Direct interaction between resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 19, p. 4004-4014, 2000.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** New York, v. 345, p. 646-651, 2006.

MELOTTO, M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BRUSCHI, A.G.; CAMARGO, L.E. Comparative bioinformatic analisys of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome**, Ottawa, v. 48, p. 562-570, 2005.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the Co-1 locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 143-149, 2000.

MITSUHARA, I.; IWAI, T.; SEO, S.; YANAGAWA, Y.; KAWAHIGASI, H.; HIROSE, S.; OHKAWA, Y.; OHASHI, Y. Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 279, p. 415-427, 2008.

OHLROGGE, J.; BENNING, C. Unraveling plant metabolism by ESTanalysis. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 3, p. 224-228, 2000.

OKUBO, K.; HORI, R.; MATOBA, N.; NIIYAMA, T.; FUKUSHIMA, A.; KOJIMA, Y.; MATSUBARA, K. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and

qualitative aspects of gene expression. **Nature Genetics**, New York, v. 2, p. 173-179, 1992.

PASTOR-CORRALES, M.A.; TU, J.C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 77-104.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, e36, 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 13, p. 62-66, 2003.

RAVA, C.A.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, p. 167-172, 1994.

VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; van ROY, N.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034.1- RESEARCH0034.11, 2002.

van LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135–162, 2006.

5 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE FEIJOEIRO COMUM DURANTE INTERAÇÃO INCOMPATÍVEL COM O PATÓGENO DA ANTRACNOSE

RESUMO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa de grande importância para a alimentação humana, tem sofrido com danos em sua produção devido à doença da antracnose, causada pelo fungo *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. – Scrib. Os mecanismos de defesa das plantas para regulação gênica são essenciais para definir a interação incompatível com o fungo patogênico. Neste trabalho, o método quantitativo RT-PCR em tempo real foi utilizado para avaliar os níveis de expressão diferencial de 12 genes em uma variedade de feijoeiro resistente - SEL 1308, previamente selecionados de uma biblioteca de ESTs (MELOTTO et al., 2005), em interação incompatível com a raça 73 do fungo *C. lindemuthianum*, considerando diferentes tecidos vegetais (folha, epicótilo e hipocótilo) e períodos após a inoculação (24, 48, 72 e 96 horas). A eficiência das curvas de amplificação (E) e ciclo de quantificação (Cq) foram determinados usando o programa LinRegPCR. As análises estatísticas e a expressão diferencial relativa dos genes foram definidas pelo programa REST, utilizando como controle interno os genes *InsDeg* e *Act2*. Como esperado, todos os genes avaliados demonstraram ser responsivos ao sistema fito-patogênico avaliado, com destaque para os genes codificadores das proteínas relacionadas à patogenênese (*PvPR1a*, *PvPR1b*, *PvPR2*, *PvPR16a* e *PvPR16b*). A expressão dos genes do feijoeiro resistente mostrou ser dependente dos tecidos e de tempo durante interação incompatível com patógeno da antracnose. Estes dados podem contribuir para um melhor entendimento das vias de defesa do feijoeiro e possível orientação em programas de melhoramento da espécie em relação à doença da antracnose.

Palavra-chave: *P. vulgaris*. *C. lindemuthianum*. Análise quantitativa. Antracnose.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), one of the major important legume for human consumption, has suffered damage in their production due to the disease anthracnose, caused by the fungus *C. lindemuthianum (Sacc. & Magnus) Lams. - Scrib*. Plant defense mechanisms to gene regulation are essential to establish the incompatible interaction with the pathogenic fungus. In this study, real time RT-PCR method was used to evaluate the changes in the expression of 12 genes in common bean resistant variety SEL 1308, previously selected from an EST library (MELOTTO et al., 2005) during incompatible interaction with race 73 of *C. lindemuthianum*, considering different plant tissues (leaves, epicotyl and hypocotyls) and periods after inoculation (24, 48, 72 and 96 hours). The efficiency (E) of amplification curves and the quantitafication cycle (Cq) were determined using the program LinReg. The statistical analysis and differential expression of target genes were defined on the REST program, using as internal control the I*nsDeg* and *Act2* genes. As expected, all analyzed genes demonstrated to be responsive to the phyto-pathogenic system evaluated, especially the genes coding for proteins related to pathogenesis (*PvPR1a*, *PvPR1b*, *PvPR2*, and *PvPR16a* and *PvPR16b*). The expression levels of genes in the resistant common bean showed to depend on tissue and time during incompatible interaction with the anthracnose pathogen. These data can contribute to a better understanding of the defense network of common bean and with breeding programs of this species that are devoted to anthracnose disease resistance.

Keywords: *P. vulgaris*. *C. lindemuthianum*. Quantitative analysis. Anthranose.

5.1 INTRODUÇÃO

As interações entre plantas e microrganismos patogênicos, durante uma longa história evolutiva, tem permitido entre as espécies envolvidas o desenvolvimento de sistemas de defesa (plantas) e infecção (patógeno) altamente especializados. No caso das espécies vegetais, os sistemas robustos de resistência permitem o estabelecimento da interação de incompatibilidade com grande parte dos agentes patogênicos (YANG; SHAH; KLESSIG, 1997). Neste caso, os mecanismos de defesa das plantas se iniciam nos sistemas pré-formados (por ex.: cutícula e parede celular) e indução rápida de respostas à infecção. A defesa induzida tem como base inicial o sistema imune que pode ser ativado por moléculas dos patógenos avirulentos (ZHANG; ZHOU, 2010). Por outro lado, a evolução dos patógenos permitiu a ocorrência de diversas proteínas efetoras (fatores de virulência) que podem bloquear a resistência basal das plantas para obter sucesso no estabelecimento da doença. Com isso, as plantas teriam evoluído uma segunda estratégia de defesa, que se relaciona com os genes de resistência ou genes R (JONES; DANGL, 1996; BENT; MACKEY, 2007), que são mediadores da resposta de hipersensibilidade (RH) e resistência sistêmica adquirida (RSA) nas plantas. A RH se caracteriza pelo evento de explosão oxidativa com o aumento da produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e consequente morte celular na região de tentativa de invasão do patógeno (HAMMOND-KOSACK; JONE, 1996; HEALTH, 2000); enquanto a RSA permite a ativação dos mecanismos de defesa em partes não afetadas na planta (YANG; SHAH; KLESSIG, 1997).

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. – Scrib., causador da doença da antracnose, tem grande importância para o cultivo do feijoeiro comum. Este patógeno permite o estabelecimento de uma doença altamente destrutiva para os cultivares suscetíveis, podendo atingir toda a parte aérea da planta e mais raramente as raízes (PASTOR-CORRALES; TU, 1989). Além disso, o fungo, que possui alta diversidade e muitas raças descritas, teria uma história evolutiva conjunta à espécie *P. vulgaris* e, consequente facilidade na quebra de resistência da planta (MELOTTO; BALARDIN; KELLY, 2000; PASTOR-CORRALES et al. 1995). A resistência do feijoeiro ao patógeno da antracnose tem sido relacionada à presença de *loci* multi-alélicos, que compreendem na maior parte genes de herança dominante, denominados de *Co* (MELOTTO; BALARDIN; KELLY, 2000; KELLY; VALLEJO, 2004; YOUNG et

al., 1998; MELOTTO; KELLY, 2000). Assim, o feijoeiro pode estabelecer uma interação de incompatibilidade a diversas raças do agente patogênico, assim como ocorre com a linhagem de feijoeiro SEL 1308 e raça 73 de *C. lindemuthianum*. Esta linhagem é caracterizada por apresentar o gene $Co4^2$, o qual confere ao feijoeiro resistência a mais de 97% das raças descritas do fungo causador da antracnose (YOUNG et al., 1998, MELOTTO; KELLY, 2001).

O feijão comum se caracteriza como a leguminosa de maior destaque na alimentação humana, especialmente das regiões mais pobres, onde se constitui como fonte importante de nutrientes e minerais (GEPTS et al., 2008). Apesar de sua importância, os recursos genômicos para o feijoeiro comum são escassos, sendo mais bem considerados com o estabelecimento do projeto global *Phaseomics* (GEPTS et al., 2008). Estudos de transcritos gênicos durante interação incompatível feijoeiro comum/*C. lindemuthianum* tem sido reportados a partir da técnica de Northern Blot (FRAIRE-VELÁZQUEZ et al., 2003; ALVARADO-GUTIÉRREZ, 2008). Por outro lado, métodos mais precisos de quantificação gênica, tal como transcritase reversa-PCR, têm sido utilizados. A técnica de RT-qPCR tem sido caracterizada pela alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na análise de genes diferencialmente expressos em diferentes tipos de amostras e condições ambientais (BUSTIN, 2002; SHIPLEY, 2006). O método RT-qPCR foi utilizada para estudos de expressão diferencial de genes em outro sistema fito-patogênico de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*/*Uromyces appendiculatus*) (THIBIVILLIERS Et al., 2009); não havendo trabalhos para o patossistema alvo deste trabalho com o uso deste método quantitativo.

Neste trabalho, 12 etiquetas de sequências expressas foram selecionadas de uma biblioteca de ESTs de feijoeiro SEL 1308 em interação incompatível com *C. lindemuthianum* (MELOTTO et al., 2005). Os níveis de expressão relativa dos genes foram avaliados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de interação com a raça 73 de *C. lindemuthianum* em tecidos de folha, epicótilo e hipocótilo do feijoeiro resistente SEL 1308 em relação aos tecidos não inoculados, através da técnica quantitativa RT-PCR em tempo real. Este trabalho teve como hipótese que estes genes são responsivos a interação incompatível entre o feijoeiro e o patógeno da antracnose. Os genes selecionados incluem cinco genes codificadores para proteínas relacionadas à patogênese (*PvPR1a*; *PvPR1b*; *PvPR2*; *PvPR16*; *PvPR16*); dois genes para proteínas inibidoras de poligalacturonase (*PvPGIa*; *PvPGIb*); um gene para fenilalanina amônia liase (*PvPAL*); um gene para

proteínas quinases (*PvMPK*); um gene para proteína repressora de ultravioleta B (*PvUVB*); um gene para profilina (*PvProf*); e um gene para proteína com ação no canal de íon controlados por nucleotídeo cíclico (*PvCINC*).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

A inoculação e a coleta de material vegetal foram realizadas no laboratório de Biologia Celular e Molecular, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA – USP), Piracicaba, SP. O agente patogênico foi cedido pela Dra. Adriane Wendland da EMBRAPA arroz e feijão (Goiânia – GO) e enviado ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade do IAC (Campinas – SP) para cultivo e preparação dos inóculos da raça 73 do fungo *C. lindemuthianum*. No Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Grãos e Fibras do IAC (Campinas – SP) foi realizada ainda a verificação da raça do patógeno.

5.2.1 Material vegetal

Foram utilizados genótipos de *P. vulgaris* da linhagem resistente a antracnose, SEL 1308, e variedade suscetível à raça utilizada no trabalho como controle positivo (Black Magic). As sementes de feijão foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 10 % (v/v) durante 10 min, lavadas em água esterilizada e colocadas para germinar em papel filtro no escuro e temperatura ambiente (± 25°C) por quatro dias. As plântulas resultantes foram transferidas para vasos com substrato comercial, sendo arranjadas de forma a obter 3 plântulas por vaso. Dois vasos foram reservados para cada período no tratamento inoculado [24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hai)] e no controle negativo ou não inoculado (24, 48, 72 e 96 horas), resultando num total de 16 vasos do genótipo resistente. Um vaso contendo a variedade suscetível (3 plântulas) inoculada foi mantido nas mesmas condições para verificar sintomas após 7 dias de interação com o patógeno.

5.2.2 Inoculação das plântulas de SEL 1308

Plântulas de 10 dias foram inoculadas com o patógeno (tratamento inoculado) com solução de inóculo com concentração 1,0 x 10^6 esporos/ml. Esta foi obtida a partir de crescimento do esporo fúngico em tecido vegetal e meio Mathur por 10 dias, temperatura ambiente (MELOTTO; KELLY, 2000). Em seguida, os vasos com as plantas inoculadas e não inoculadas, foram embalados com plástico translúcido, mantendo assim o acesso à luz e umidade necessária (± 100 %). Os vasos foram ainda mantidos em sala com temperatura e fotoperíodo controlado (± 22°C e 16h de luz: 8h de escuro) para possibilitar as melhores condições ao desenvolvimento do fungo. Este experimento foi repetido três vezes.

5.2.3 Coleta do material vegetal

Para cada tratamento foi obtido um *bulk* de tecido para folha (F), epicótilo (E) e hipocótilo (H) da linhagem resistente SEL 1308. Cinco plântulas de cada período estudado (24, 48, 72 e 96 horas) foram utilizadas para obtenção das folhas, epicótilos e hipocótilos, formando assim 12 *bulks* considerando órgãos, períodos e tratamentos (ex.: F - 24/48/72/96 horas - inoculado/ não inoculado) (Figura 4.1). O material vegetal foi coletado, embalado em papel alumínio e, prontamente, congelado com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenado a -80°C. Esta coleta foi repetida para cada replica experimental.

5.2.4 Genes relacionados à defesa em feijoeiro comum e desenho de *primers*

Doze sequências transcritas (ESTs) foram previamente obtidas de bibliotecas de ESTs durante interação incompatível feijoeiro comum SEL 1308 e *C. lindemuthianum* (MELOTTO et al., 2005) (Anexo I); e anotadas a partir da ferramenta BLASTX (ALTSCHUL et al., 1990), utilizando o banco de dados de sequências protéicas não redundantes do banco de dados do NCBI (Tabela 4.1). Nestas bibliotecas foram

observadas diferenças no número de transcritos dos genes responsivos ao tratamento avaliado. Os genes de referências utilizados como normalizadores foram *InsDeg* e *Act2*.

Tabela 5.1 - Anotação das 12 ESTs pelo programa BLASTX, no banco de dados do NCBI

Gene	**ID[1]**	**GI**	**Funcão**	**Organismo**	***Score***	***E value***	**I[2]**
PvPR1a	PVEPSE3029H20.g	ABF13312.1	*PR1-like protein*	*Phaseolus vulgaris*	298	2e-79	99%
PR1b	Contig186	ADP69172.1	*Pathogenesis related protein-1*	Populus tomentosa	238	7e-61	69%
PvPR2	Contig458	AAY96764.1	*1,3-beta-D-glucanase*	Phaseolus vulgaris	540	1e-151	100%
PvPR16a	Contig199	ACG69484.1	*Germin-like protein 8*	*Glycine max*	312	2e-83	86%
PvPR16b	Contig202	ACG69486.1	*Germin-like protein 10*	Glycine max	327	9e-88	88%
PvPGIa	PVEPSE3010D06.g	CAD56505.1	*Polygalacturonase inhibitor-like protein*	Cicer arietinum	549	1e-75	82%
PvPGIb	Contig413	ABO47744.1	*Polygalacturonase-inhibiting protein*	Gossypium hirsutum	417	2e-51	72%
PvPAL	Contig535	ACS88364.1	*Phenylalanine ammonia-lyase 2*	Glycine max	132	1e-29	90%
PvMAP	PVEPSE3028E14.g	CAC69137.1	*MEK map kinase kinase*	*Medicago sativa subsp. x varia*	282	1e-74	93%
PvUVR	Contig514	AAQ21122.1	*Ultraviolet-B-repressible protein*	*Trifolium pretense*	99,4	3e-19	68%
PvProf	Contig378	AAU43733.1	*Profilin*	Citrullus lanatus	223	6e-57	91%
PvCNC	Contig435	AAX18166.2	*Cyclic nucleotide-gated ion channel 2*	Gossypium hirsutum	261	5e-68	80%

[1]ID: identificação das sequências em Anexo A; I: identidade da sequência da biblioteca com a sequência anotada[2]

O desenho dos *primers* foi realizado a partir do programa *PRIMER* 3, considerando os seguintes parâmetros: a) tamanho do produto: 100 – 200 pb; b) tamanho do *primer*: 18 – 22 pb; 3) temperatura de *melting*: 57 – 63°C; 4) quantidade de GC: 40-60%. A qualidade dos *primer*s foi analisada a partir da ferramenta *Oligo Analysis Tool* (www.operon.com), a fim de evitar a formação de estruturas secundárias. O DNA SEL

1308 controle (não inoculado), obtido a partir do método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), foi utilizado para verificação da especificidade dos *primer*s. A reação de amplificação das 12 sequências com os *primer*s desenhados (Tampão 1X; 3 mM $MgCl_2$; 0,2 mM DNTPs; 0,2 µM *primer* Forward/Reverse; DNA, 0,2 U/µL *Taq polimerase*) foi submetida as seguintes condições: 10 min a 94°C para desnaturação de moléculas; 40 ciclos para amplificação do DNA consistindo de 30 seg a 94°C para desnaturação, 30 seg a 55°C para anelamento de *primers* e 1 min a 72°C para extensão da fita; e um ciclo final de 7 min a 72°C para extensão final. A especificidade dos *primers* foi analisada separando os produtos de amplificação no sistema eletroforético em gel de agarose 2%.

5.2.5 Extração do RNA total

Para cada amostra descrita no item 4.2.3, o material vegetal foi submetido ao reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a quantificação do RNA total isolado foi realizada no espectrofotômetro (Nanodrop 2000c), considerando uma relação ideal de comprimento de onda ($1,8 \leq A_{260/280} \leq 2,0$); e a sua qualidade foi verificada através da visualização dos padrões de bandas do RNA total separadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Em adição, para garantir a purificação do RNA, foi realizado o tratamento com DNAse, a partir do kit DNAse1, RNAse-Free (Fermentas).

5.2.6 RT-PCR quantitativo

Para evitar ruído entre corridas, a amplificação dos dois genes de referência e genes alvos no controle e no tratamento inoculado, que seriam comparados, foi realizada numa mesma placa de qPCR. A reação de amplificação destes genes e obtenção de dados brutos de fluorescência foram realizadas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) em um único passo usando 100 ng de RNA total e kit 2X Sensimix™ SYBR & ROX one-Step (Peqlab). As condições de amplificação foram realizadas da seguinte forma: um ciclo por 10 min a 42°C para síntese de cDNA e 10 min a 95°C para desnaturação da transcritase reversa e ativação da Taq DNA polimerase; 40 ciclos de

amplificação do cDNA de 15 s a 95°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C e captação do sinal de fluorescência. A etapa final compreendeu a curva de dissociação que inclui um ciclo final de 15 seg a 95°C para desnaturação dos produtos gerados e medida da fluorescência a cada variação de 0,7°C, com temperatura inicial 60°C e final 95°C. Para cada condição, três replicatas experimentais foram utilizadas.

5.2.7 Análise dos dados

Os dados brutos (dados sem correção da linha de base) dos níveis de fluorescência foram submetidas ao programas LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), sendo assim realizada a correção da linha de base e regressão linear para cada curva. Além disso, foi possível obter a janela de linearidade, de onde foi gerada uma reta com inclinação utilizada para cálculo da eficiência, considerando $E= 10^{slope}$ e $1.8 \leq E \leq 2$; e correlação maior que 0.995 para cada amostra. Por fim, com valor comum de *threshold* foram definidos os valores dos ciclos de quantificação (C_q).

Os valores de expressão relativa dos genes alvo normalizados e testes estatísticos foram obtidos no programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL et al., 2002), com base nas eficiências médias do *amplicon* e valores de Cq. Para normalização foram utilizados os genes *Act2* (F:CCAATTCAACCATCCCTCAC/ R:AAACTCCTCTGCACCCTCAG) e *InsDeg* (F:TGCATACGTTGGTGATGAGG/ R:AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG). A análise estatística tem como base um teste de realocação fixa aos pares (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*), sendo definida a significância dos valores de expressão diferencial (tratamento/controle) dos genes alvos, com *bootstrap*=2000 permutações (PFAFFL et al., 2002).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Especificidade e eficiência dos *primers*

A análise de especificidade e eficiência dos *primers* tem como base a ausência de bandas inespecíficas no gel de agarose e número e amplitude dos picos obtidos na curva de *melting* do *amplicon* de cada transcrito analisado.

Foi observado no gel de agarose 1% apenas uma banda do tamanho esperado (Figura 5.1). Além disso, as curvas de *melting* apresentaram um único pico bem definido com temperatura elevada (Figura 5.2). Por fim, com exceção de *PvPR1b*, todos os valores médios de eficiência apresentaram-se maiores de 1,9, o que corresponde a uma curva de amplificação com eficiência maior 90% (Tabela 5.2). Portanto, todos os *primer* obtidos para análise da expressão gênica nos diferentes tecidos do feijoeiro SEL 1308 apresentaram alta especificidade e eficiência média.

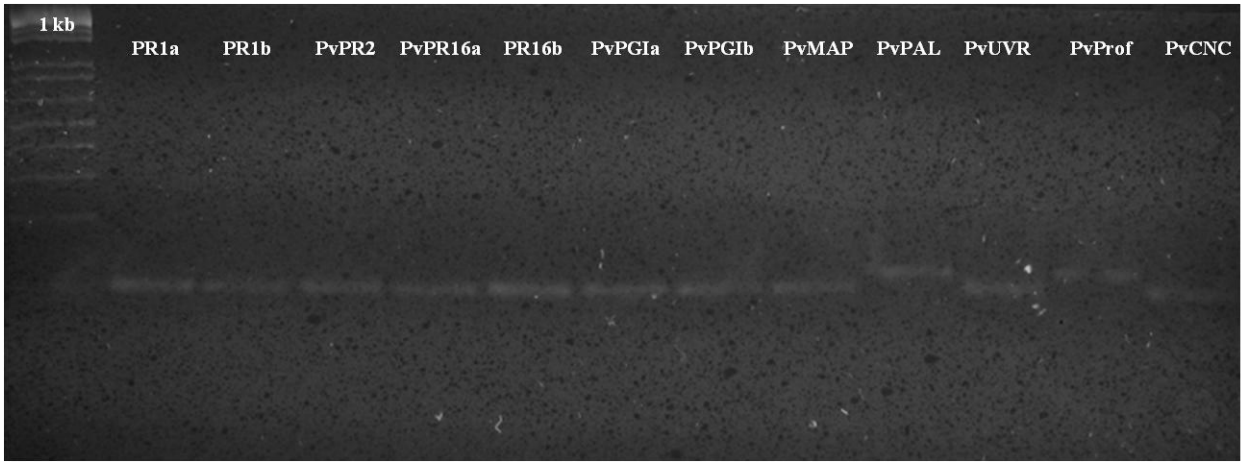


Figura 5.1 – Produtos de amplificação em gel de agarose 2% obtidos do DNA de SEL 1308 e os pares de *primers* desenhados para 12 sequências de interesse

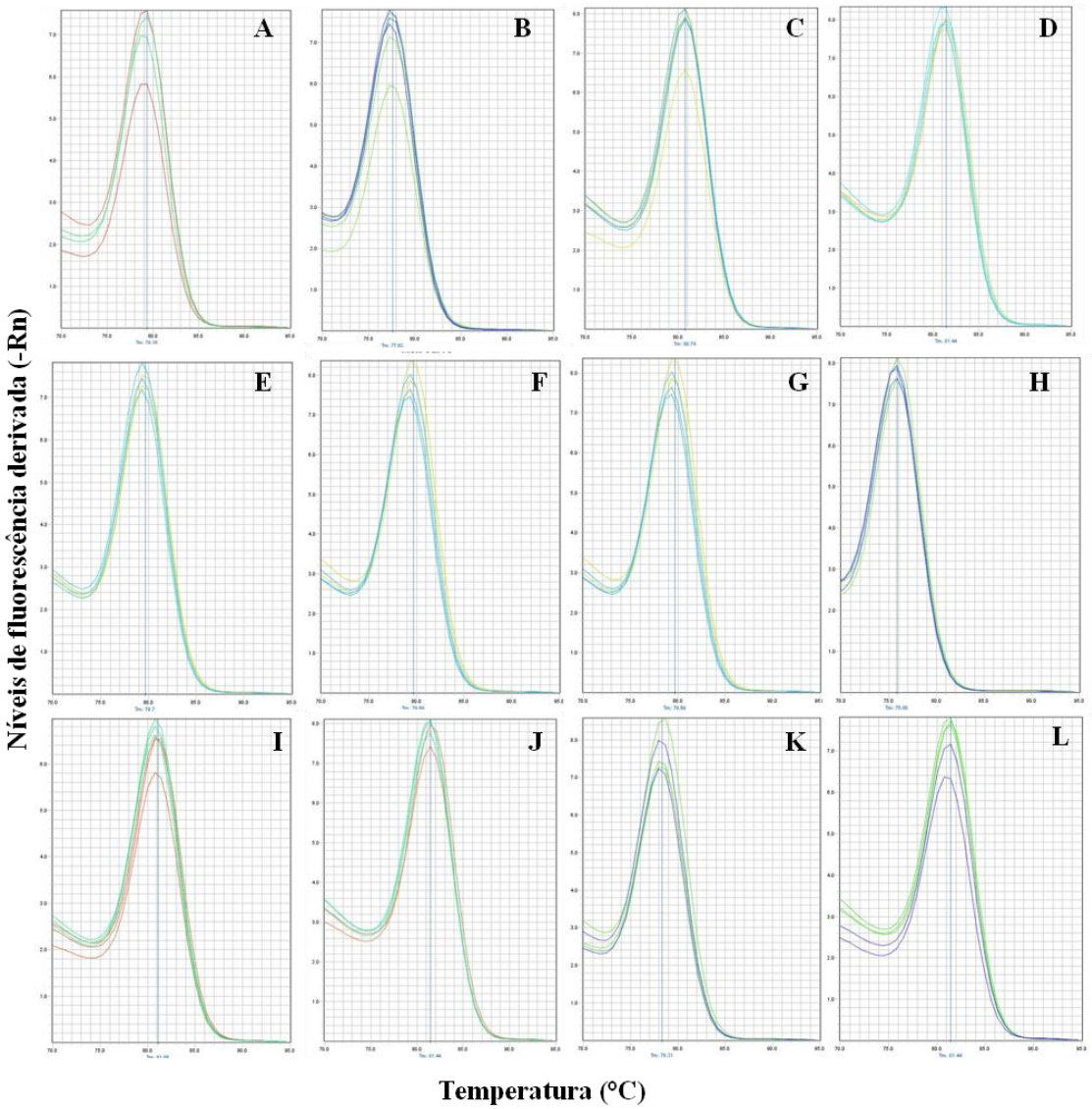


Figura 5.2 - Curvas de *melting* dos produtos de amplificação dos 12 genes analisados (A: *PvPR1a*; B: *PvPR1b*; C: *PvPR2*; D: *PvPR16a*; E: *PvPR16b*; F: *PvPGIa*; G:*PvPGIb*; H: *PvPAL*; I: *PvMAP*; J: *PvUVR*; K: *PvProf*; L: *PvCNC*)

Tabela 5.2 -.Relação dos *primers* utilizados para amplificação dos 12 transcritos, valores dos ciclos de quantificação (Cq) média e eficiência média obtida a partir do programa LinRegPCR

Gene	**Sequência *Forward*/*Reverse***	**Tamanho da sequência (pb)**	**Cq**	**Eficiência média**	**Tm[1]**
PvPR1a	F:AAGGAGATGCTCCACCCAATG R:CAGGGATTGGCCAGAAGGTA	100	18,176±1,611	1,917±0,006	79,35
PvPR1b	F:ACCAATTAGATGGGATGCAACAGT R:CCCATAAGGACCCCCAGAGT	100	22,663±2,162	1,882±0,017	77,62
PvPR2	F:AGCAGCTCTGCAAGCACTCA R:ACGAGCAGTGTCGGCATTG	100	21,14±2,37	1,917±0,001	80,74
PvPR16a	F:GCAGACCTCAAAAGTGCAGATG R:CAGCTTCAGATAAGCCAGCAAA	100	31,162±5,284	1,909±0,007	81,44
PvPR16b	F:AGAGGGTCAAATCTGTGCTGGAT R:CAACAAGCCCTGAGGGAACA	100	23,447±3,449	1,911±0,005	79,7
PvPGIa	F:GCCTCACGGTGCTGAACAT R:TTGTTACGGAGATCCAAGTGCAT	100	24,149±2,39	1,915±0,0149	84,56
PvPGIb	F:AAGACAAATCCAAAGCCATGAAA R:GGCGGAATGGGTATTTTGAA	100	21,754±0,09	1,92±0,021	79,69
PvPAL	F:ATGGTGCTCCTCTTCCAATTTG F:TGATTTGCCACAGGCTTACAGA	120	21,895±0,798	1,919±0,008	75,88
PvMAP	F:CGAGAGGATCAACACGGACATA R:CCTGCCCATGTAGAACTCCAA	100	25,679±0,746	1,919±0,006	81,08
PvUVR	F:CCACTTCCGAGGCACTGTTC R:ATGGATGCCCTCACCTGAAA	100	22,215±1,144	1,919±0,008	81,44
PvProf	F:CCGGAAGAAATAACTGGGATCA R:AATGACAGAGCCGGGTTCAC	120	20,944±0,449	1,928±0,008	78,31
PvCNC	F:CATAAAGCGCAGCCAAAGTCT R:GCGAAGGCACCATGAAAGTAG	100	24,799±0,437	1,911±0,001	81,44

[1]Temperatura de *melting* dos *primer*s utilizados na análise de RT-qPCR.

5.3.2 Expressão diferencial dos genes relacionados à interação incompatível SEL 1308 e *C. lindemuthianum*

A análise dos níveis de expressão relativa (ER) dos genes durante os diferentes períodos de interação entre SEL 1308 e a raça 73 de *C. lindemuthianum* comparando com os tecidos controle (Figura 5.3) revelou diferentes padrões de resposta gênica que podem ser considerados essenciais nos mecanismos de defesa do feijoeiro durante interação com o patógeno da antracnose.

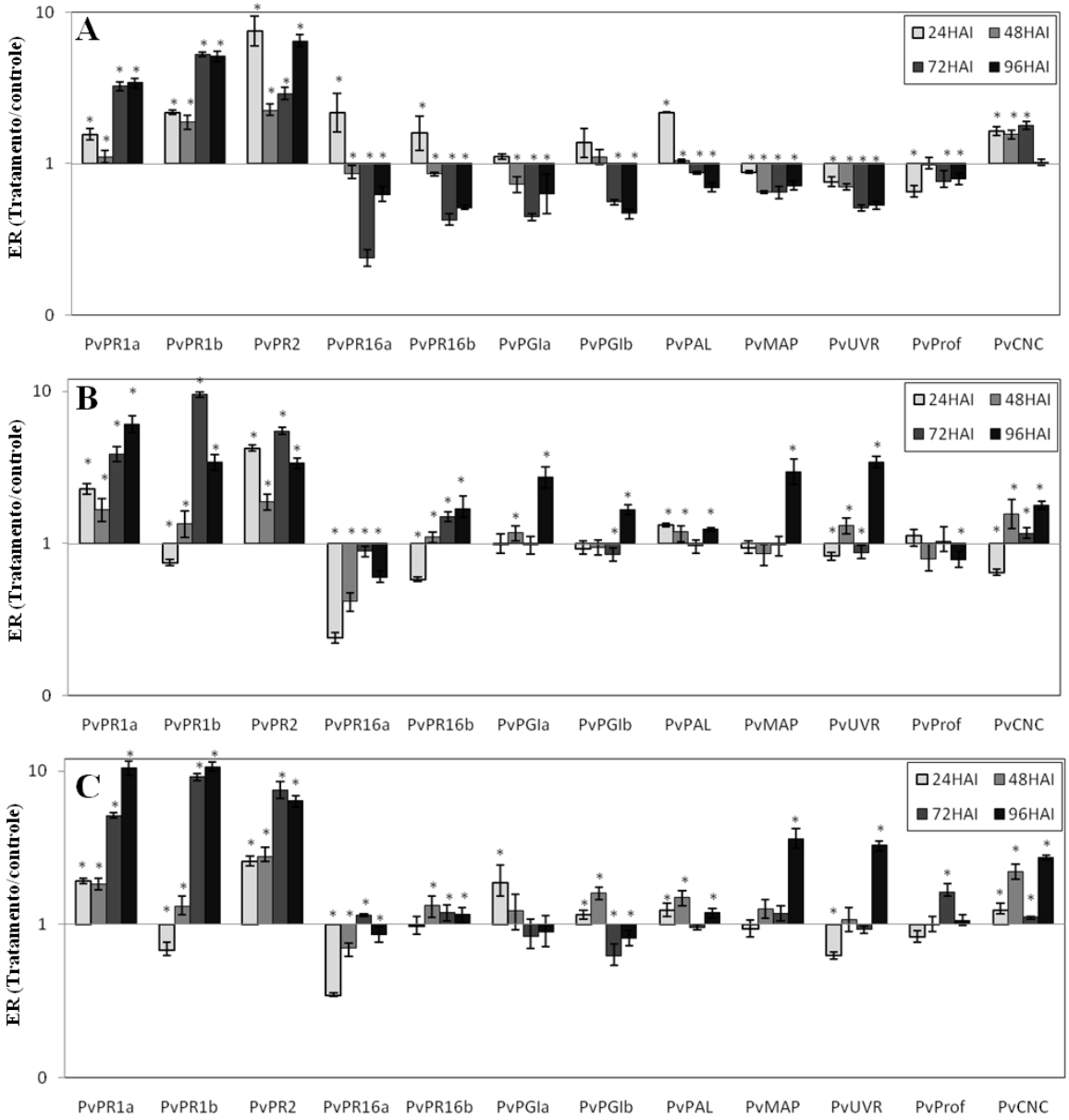


Figura 5.3 - Expressão relativa (ER) dos 12 genes em tecidos de folha (A), epicótilo (B) e hipocótilo (C) de feijoeiro SEL 1308 durante tratamento de 24, 48, 72 e 96 horas de interação incompatível com a raça 73 do *C. lindemuthiaum* em comparação com o controle (tecidos não inoculados). O símbolo * indica que a ER do transcrito do gene apresentou valores significativos em $P \leq 0,05$

5.3.2.1 Genes relacionados às proteínas PR

Em relação aos genes (*PvPR1a*, *PvPR1b*, *PvPR2*, *PvPR16a* e *PvPR16b*) codificadores das famílias de proteínas relacionadas à patogênese, ou *pathogenesis related* (PRs), todos responderam ao patossistema avaliado, entretanto os padrões de expressão foram diferenciados. No caso dos genes *PvPR1a* e *PvPR1b* foi observado o

acúmulo de transcritos mais evidente nos períodos de 72 hai e 96 hai em todos os tecidos avaliados (Figura 5.3). Estes dados podem ser relacionados com a presença constitutiva de proteínas PRs nos tecidos vegetais Edreva (2005), que permitem reserva de proteção para a planta e indução nos níveis de expressão perceptível nos períodos mais tardios. O perfil transcricional do gene *PvPR1b* pode indicar ainda transdução de sinal entre os tecidos avaliados, podendo sugerir reconhecimento inicial nas folhas e posterior ativação do gene no epicótilo e hipocótilo que apresentaram acúmulo maior de transcritos nos períodos mais tardios (72 hai e 96 hai). Estes eventos de sinalização ocorrem, geralmente, a partir de hormônios, tais como ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico, que podem ativar os genes PR (PARK et al., 2004; EDREVA, 2005).

A família 1 das proteínas PR tem sido caracterizada por possuir efeito inibitório sobre os patógenos fúngicos em diversos patossistemas, tais como o feijoeiro e *Uromyces fabae* (NIDERMAN et al., 1995) e o tomate e *Phytophthora infestans* (RAUSCHER et al., 1999). De forma contrária, o silenciamento do gene *PR1b* em cevada resultou na suscetibilidade da planta ao fungo patogênico *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (SCHULTHEISS et al., 2003). Em adição, foi verificado que plantas transgênicas para os genes das proteínas PR1 apresentaram aumento de resistência a patógenos, o que pode ser exemplificado pela interação *Peronospora tabacina* transgênica e *Phytophthora parasitica var. nicotianae*, com aumento de tolerância ao patógeno durante super expressão do gene *PR1* no tobacco (ALEXANDER et al., 1993). Apesar da relação destas proteínas com os mecanismos de resistência da planta, as proteínas codificadas por estes genes possuem ainda função desconhecida (EDREVA, 2005). A família PR1 é amplamente conservada em plantas, podendo ainda ser encontrada em levedura, insetos e vertebrados. A ampla distribuição desta família sugere mesma origem evolucionária e que estes genes possuem atividade essencial para o funcionamento e sobrevivência dos organismos vivos (van LOON; REP; PIETERSE, 2006).

No estudo, o gene *PvPR2* apresentou o acúmulo mais precoce no patossistema estudado (Figura 5.3). Os genes, pertencentes à família 2 das proteínas PRs e caracterizados com a função de beta-1,3 glucanase, têm sido fortemente relacionados com o mecanismo de resistência das plantas contra agentes patogênicos (CASTRESANA et al., 1990; EDREVA, 2005). Este gene apresentou elevado acúmulo de transcritos no início da interação com o patógeno avirulento (24 hai), com destaque para os tecidos foliares. Este resultado pode indicar que os genes relacionados à família 2 das PR seriam

ativados com maior rapidez nas folhas do que nos demais tecidos. Apesar das mudanças nos níveis de expressão durante os períodos, os altos valores de ER foram todos relacionados à super expressão do gene em todos os tecidos analisados, o que corrobora com a importância destes transcritos no mecanismo de defesa direta do feijoeiro contra o patógeno da antracnose. Na cenoura e tabaco transgênicos, o gene codificado para beta-1,3 glucanase demonstrou resistência a diversos fungos patogênicos (MELCHERS et al., 1998). Estas proteínas relacionadas com o mecanismo de defesa direto das plantas, contribuem para a diminuição acentuada no crescimento do patógeno, permitindo assim que o hospedeiro tenha tempo de operar os sistemas de defesa. Além disso, nos mecanismos indiretos, a ação enzimática destas proteínas sobre a parede celular do patógeno permite a liberação de moléculas sinalizadoras de reconhecimento da planta (WARD et al., 1991). Assim, este gene teria papel fundamental no estabelecimento da interação incompatível entre o feijoeiro e o fungo causador da antracnose.

As proteínas *Germin-like* (GL), relacionadas à família 16 das PRs (PR16) (van LOON; REP; PIETERSE, 2006), são glicoproteínas de parede celular e possuem papel importante na defesa das plantas a patógenos (LANE et al., 2002). No presente estudo, os genes (*PvPR16a*; *PvPR16b*) demonstraram níveis de expressão mais transiente entre os períodos, com destaque para o gene *PvPR16b* (Figura 5.3). Este tipo de padrão foi evidenciado por Membré et al. (1997), onde os transcritos do gene para as proteínas GL demonstraram perfil diferenciado em diferentes tecidos (flor, folha, raiz e semente) de Arabidopsis sob diversas condições (germinação, ciclos circadianos e diferentes períodos de desenvolvimento), pela técnica de hibridização por *Northen blot*. Apesar de o nome das proteínas *Germin-like* sugerir especificidade com o processo germinativo, estas proteínas, com atividade oxalato oxidase, podem ser relacionadas com o desenvolvimento celular, recepção de sinal e resistência a estresse, em especial infecção por agentes patogênicos (LANE, 2002). O papel como receptoras de sinal, resultaria numa maior adaptação destas proteínas a diferentes ambientes celulares, onde a maior parte das evidências indica ocorrência na matriz extracelular (MEMBRÉ et al., 2000).

Nos tecidos foliares, o gene *PvPR16a* e *PvG16b* apresentaram ainda o mesmo perfil transcricional com aumento de expressão no período de 24 hai e, subsequente, queda de expressão nos tratamentos inoculados (Figura 5.3). Com isto, pode ser sugerido que, nas folhas, estes genes estejam relacionados com os mecanismos de reconhecimento da planta ou mesmo enrijecimento da parede celular e reação de hipersensibilidade,

devido ao envolvimento das proteínas GL com a produção de H_2O_2 (DUMAS et al., 1993). Em análise de *Northern blot*, o gene codificador da proteína *Germin-like* (*CaGLP1*) iniciou o acúmulo preferencialmente durante a reação de hipersensibilidade em interação incompatível entre a pimenta e bactéria *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (PARK et al., 2004).

Para o gene *PVPR16a* foi observado expressão diferencial negativa na maior parte dos períodos nos tecidos estudados, principalmente, no epicótilo e hipocótilo. A supressão destes genes em interações de incompatibilidade pode ser relacionada com desenvolvimento celular (por ex.: expansão celular) (LANE, 1994), que no caso é a função gênica predominante no epicótilo e hipocótilo. Este tipo de resposta se associa com a tendência das plantas em regular, temporariamente, de forma negativa os genes relacionados com o desenvolvimento celular com o intuito de expender mais energia para ativação de genes em outras vias relacionadas à defesa características ao patossistema estabelecido.

As respostas de defesa para o gene *PvPR16b*, entre o tecido foliar e o epicótilo, se mostraram antagônicas (Figura 5.1). Por exemplo, no período de 24 hai nos tecidos de folha houve uma expressão diferencial positiva em torno de 1,6 vezes comparado com o tecido controle, enquanto que no epicótilo neste mesmo período houve supressão dos transcritos em torno de 1,7 vezes. Estes dados, podem indicar a possível participação do gene *PvPR16b* nos mecanismos de reconhecimento das respostas de defesa, na sinalização entre a folha e o epicótilo. Por outro lado, o hipocótilo apresentou resposta semelhante à folha, porém mais tardia, onde foi observada indução do gene no tratamento 48 hai e, subsequente, diminuição dos níveis de expressão nos períodos seguintes. Assim, os resultados sugerem que, na folha e no hipocótilo, este gene poderia ser mais diretamente relacionado com os mecanismos de defesa na planta, enquanto que no epicótilo, a resposta corresponderia, primordialmente, à função no desenvolvimento da planta.

5.3.2.2 Genes relacionados às proteínas inibidoras de poligacturonase

As proteínas inibidoras de poligalacturonase (*poligacturonase inhibitor*, PGI) possuem regiões ricas em repetições de leucinas ou termo em inglês *leucine-rich repeats* (LRRs). As proteínas LRR em particular, se destacam na transdução de sinal, adesão celular, desenvolvimento, reparo do DNA, recombinação, transcrição e processamento do RNA. Estas proteínas estão presentes desde bactérias ao homem, e ainda são encontradas na maior parte dos compartimentos celulares (KOBE; DEISENHOFER, 1995). Em adição, nos mecanismos de defesa das plantas contra fungos, as proteínas PGIs são relacionadas com ação específica sobre as endopoligalacturonases dos microrganismos fitopatogênicos, limitando sua atividade. (De LORENZO et al., 1994).

Nas células vegetais, a PGIs são produzidas constitutivamente e localizadas na parede celular para serem, prontamente, utilizadas nos mecanismos de defesa da planta. A quantidade mantida de PGI pela planta pode ser suficiente nas fases iniciais de infecção para anular a ação do fungo patogênico, já que as PGIs do feijoeiro resistentes tendem a demonstrar alta especificidade com as poligalacturonases do *C. lindemuthianum*. Esta especificidade pode ser relacionada com a co-evolução ocorrida entre as duas espécies. Esta capacidade das plantas em evoluir as PGIs para as PGs de patógenos fúngicos foi relatada por De LORENZO; D'OVIDIO; CERVONE (2001). Além disso, a caracterização de genes codificadores de PGI revelaram ampla variação de especificidade destas proteínas nas plantas determinados pelos fungos invasores. Assim, a especificidade foi relacionada à presença de diferentes isoformas das PGIs, onde cada proteína contribui em parte para atividade inibitória do fungo patogênico (De LORENZO; D'OVIDIO; CERVONE, 2001).

Os genes *PvPGIa* e *PvPGIb*, mostraram respostas diferenciadas de expressão entre os tecidos analisados (Figura 5.1). No tecido foliar, a expressão gênica relativa foi regulada negativamente (Figura 5.1.A), enquanto no epicótilo e hipocótilo houve predominância de acúmulo de transcritos. No epicótilo foi evidente a expressão relativa positiva no período tardio (96 hai) (Figura 5.1.B) e no hipocótilo ocorreu ER positiva nos períodos mais precoces (24 hai e 48 hai) (Figura 5.1.C). Neste caso, nos tecidos foliares, os transcritos PGI podem ser relacionados com proteínas PGI mais bem relacionadas com funções básicas nas células devido à supressão do gene, ou mesmo os transcritos podem

ter apresentado acúmulo significativo em períodos mais recentes que 24 hai. Guerrero-Gonzaléz (2011) verificou que os transcritos de PGIs se acumularam logo no início (8 hai) da infecção de raízes de feijoeiro suscetível em contato com o fungo *Rhizoctonia solani*. Por outro lado, no epicótilo e hipocótilo, os padrões de expressão dos genes *PvPGIa* e *PvPGIb* indicam participação nos mecanismos de defesa do feijoeiro ao patógeno analisado, sugerindo ainda que a resposta rápida de defesa ocorra nos tecidos do hipocótilo.

A expressão de genes relacionados às PGIs demonstra ser precoce, rápida e transiente em folhas cotiledonares de feijoeiro em associação com reação de hipersensibilidade (NUSS et al., 1996). No feijoeiro, os maiores níveis de atividade da proteína foram detectados em zonas de transição entre região de elongação e maturação de hipocótilo jovem, na região basal do caule de plantas adultas, nas regiões de elongação do hipocótilo estiolado, nas flores e nas vagens. Os transcritos de PGIs se acumularam em hipocótilo de *P. vulgaris* em resposta a ferimento e tratamento com ácido salicílico (BERGMANN et al., 1994). Na interação incompatível entre *C. lindemuthianum* e *P. vulgaris*, ocorreu um rápido acúmulo de RNAm correlacionado com a resposta de hipersensibilidade em interação incompatível, enquanto o atraso no aumento de expressão coincide com o estabelecimento de compatibilidade (NUSS et al., 1996). Apesar de ser interessante observar os padrões de expressão dos genes nos períodos mais recentes, pode ser sugerido que os genes para *PvPGI* avaliados estejam desempenhando papel de defesa especialmente no epicótilo e hipocótilo do feijoeiro.

5.3.2.3 Gene relacionado à enzima fenilalanina amônia liase

Na resposta de defesa precoce das plantas pode ser destacada a ativação do metabolismo dos fenilpropanóides (DIXON; PAIVA, 1995), onde a enzima *Phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) se faz essencial. Em plantas saudáveis, a PAL permite a síntese de aminoácidos, mas no processo de infecção e injúria o seu substrato pode ser convertido em ácido trans-cinâmico, para entrar na via de biossíntese dos fenilpropanóides, que incluem grupos de fitoalexinas e precursores das defesas estruturais, tal como a lignina (RAES et al, 2003). Em resposta a infecção ocorre aumento na atividade enzimática da PAL, que parece estar relacionada com o aumento na síntese

de nova enzima ao invés do aumento de atividade das enzimas existentes (LUCAS, 2008).

Na análise da diferença de expressão do gene *PvPAL* na interação incompatível estudada foi possível verificar expressão diferencial transiente nos períodos analisados, apresentando maior acúmulo de transcritos nos períodos iniciais de expressão (Figura 5.1). O perfil transcricional de resposta rápida e transiente tem sido descrito para os genes relacionados à PAL em interações hospedeiro-patógeno (LUCAS, 2008). Assim, pode ser destacado nas folhas, que o gene *PvPAL* apresentou acúmulo precoce de transcritos no período de 24 hai, revelando níveis de expressão em torno de duas vezes maior do que o controle, seguido por diminuição nos níveis de expressão nos períodos mais tardios (Figura 5.1.A). Além disso, em comparação com os outros tecidos, pode ser verificado que nos tecidos foliares o gene *PvPAL* possui resposta mais acentuada e rápida a interação de incompatibilidade avaliada, onde a ER positiva foi menos pronunciada. Kervinen et al. (1998) reportaram a expressão diferencial tecido-específica de quatro genes relacionados a PAL de cevada a partir e da infecção pelo fungo *Bipolaris sorokiniana*.

5.3.2.4 Gene relacionado às proteínas quinases

As proteínas quinases ativadas por mitógenos ou *mitogen activated protein kinases* (MAPK) são relacionadas à transdução extracelular de sinais a partir de uma cascata de fosforilação reversível. Enquanto estes eventos amplificam sinais específicos, eles também integram diferentes sinais através da inter-comunicação de outras vias de maior complexidade (MADHANI; FINK, 1998).

O gene *PvMAP* avaliado neste estudo, mostrou níveis de ER negativo nas folhas, e positivo nos tecidos do epicótilo e hipocótilo (Figura 5.1). A supressão do gene MAP nas folhas pode ser relacionada com os mecanismos de defesa da planta. Apesar das MAP serem usualmente utilizadas como moléculas de sinalização que estariam relacionadas com a ativação transcricional de genes de resistência, tal como ocorrido no epicótilo e hipocótilo, pode também ocorrer a supressão dos genes de defesa destas vias devido a interferência de moléculas inibidoras do patógeno, que podem interagir e bloquear as vias de ação das proteínas MAP. Por outro lado, as plantas resistentes teriam evoluído

mecanismos indiretos que reconhecem estas alterações e, consequentemente, ativam outras vias de defesa (CHISHOLM et al., 2006). Pertensen et al. (2000) demonstraram que o mutante para um gene MAP (mpk4) exibiu resistência adquirida constitutiva, onde a perda de função do gene levou ao aumento dos níveis de ácido salicílico (AS), exibindo assim aumento da resistência aos patógenos virulentos. Além disso, estudos indicam que as proteínas MAPs seriam reguladoras negativas do AS e envolvidas na integração das respostas dependentes de AS e AJ para, seletivamente, permitir defesa contra tipos patógenos particulares ou estresses ambientais (FELTON et al., 1999; PIETERSE; van LOON, 1999).

5.3.2.5 Gene relacionado com as proteínas profilinas

As proteínas relacionadas à profilina se associam com a actina em 1:1 (profilina-actina) do citoesqueleto celular, sendo assim relacionadas com a regulação da polimerização da actina e mobilidade celular, tal como mobilidade e proliferação celular (TAMURA et al., 2000). Na defesa das células vegetais em resposta de defesa em relação a fungos patogênicos, a profilina pode auxiliar na formação de um espessamento localizado da parede celular no local de infecção, sendo esta formação de prevenção a entrada do patógeno denominada de papila (SHMELZER 2002).

O gene para a profilina avaliado neste trabalho (*PvProf*) mostrou níveis de ER negativos nas folhas e epicótilo e acúmulo de transcritos em 72 hai no hipocótilo. A supressão dos genes relacionados a profilina pode ser relevante para interferir no desenvolvimento da infecção por patógenos. Em biblioteca subtrativa de cDNA de uma interação de incompatibilidade entre o trigo e o fungo *Puccinia striiformis f. sp. tritici* foi obtido um gene para a profilina (*TaPRO*). Este gene foi analisado pelo método quantitativo por RT-PCR e apresentou níveis de transcritos regulados negativamente, que contribuiriam com maior defesa das plantas devido à aceleração da polimerização da actina do citoesqueleto celular (SONG et al., 2011).

5.3.2.6 Gene relacionado à proteína reprimida por ultravioleta-B

A exposição das plantas à radiação ultravioleta-B (UV-B) tem sido relacionada com o aumento na produção de espécies de oxigênio reativo, resultando em reações similares a resposta de hipersensibilidade característica das interações incompatíveis ente planta-patógeno (LANGEBARTELS et al., 2002; OLBRICH et al., 2005). Além disso, a radiação UV-B pode ser relacionada com a regulação do fechamento e abertura de estômatos nas plantas, mediados pela via de etileno e produção de H_2O_2 (HE et al., 2011).

No presente trabalho, o gene *PvUVR* foi responsivo ao estresse biótico avaliado, com supressão nos tecidos foliares e acúmulo dos transcritos no período mais tardio (96 hai), nos tecidos do epicótilo e hipocótilo (Figura 5.3). Os níveis de RNAm de proteínas localizadas nos cloroplastos sofre grande redução após exposição pela radiação UV-B, devido a diminuição das atividades fotossintéticas nas plantas. Isto sugere que o gene *PvUVR*, deve ser relacionado com proteínas reguladoras das atividades fotossintéticas, sendo estas também reprimidas durante ataque por patógeno, assim como seriam em exposição ao UV-B. As plantas em condição de estresse tem como regra diminuir a atividade na fotossíntese, predominantemente com uma resposta negativa nas folhas. Por outro lado, a indução do gene no epicótilo e hipocótilo, pode sugerir que este gene tenha papel mais relacionado com os mecanismos de defesa ou mesmo transdução de sinal, devido à alta semelhança do perfil transcricional com aquele apresentado pelo gene *PvMAP*. Na biblioteca de ESTs desenvolvida por Melotto et al. (2005) foi observado que transcritos deste gene estavam presentes apenas nas bibliotecas de feijoeiro inoculado com o patógeno avirulento. Apesar de inferir a importância do gene no estabelecimento da interação incompatível planta-patógeno, o entendimento sobre a participação destas proteínas nos mecanismos de defesa das plantas ainda é pouco esclarecido.

5.3.2.7 Gene relacionado com o canal de íons mediados por nucleotídeos cíclicos

O gene codificador para as proteínas reguladoras dos canais de íons mediados por nucleotídeos cíclicos (CNC) podem ser relacionado com as respostas de defesa precoce das plantas, devido às mudanças de fluxo de íons, incluindo um influxo de H^+ e Ca_2^+ e um efluxo de K^+ e Cl^- (ATKINSON et al., 1996). Destes íons, Ca_2^+ tem sido relacionado com

a atuação como mensageiro secundário, o qual se mantém elevado após a infecção do patógeno ou tratamento com elicitores e é associado com a indução de uma variedade de respostas de defesa vegetal, dentre elas, a ativação da explosão oxidativa e reação de hipersensibilidade (SASABE et al., 2000).

O gene *PvCNC* apresentou níveis de ER positivos na maior parte dos tratamentos no patossistema avaliado (Figura 5.1), o que corrobora com a importância dos canais de íons para as vias de defesa das plantas resistentes. Melotto e colabores (2005) relataram maior número de ESTs para este gene em interação incompatível entre o mesmo sistema fito-patogênico avaliado neste trabalho. Nas folhas, o gene *PvCNC* apresentou resposta de defesa mais rápida e precoce em comparação com os demais tecidos avaliados. A ativação destes genes como importante mecanismo de defesa pôde ser evidenciado com os mutantes de Arabidopisis para genes relacionados ao canal de Ca_2^+, onde estes genes demonstraram supressão da morte celular por RH durante infecção com vários patógenos avirulentos (YU et al., 1998; BALAGUÉ et al., 2003). Os mutantes de *CNC* sugerem ainda o envolvimento destes genes na resistência mediada pelo gene R.

5.4 CONCLUSÕES

Em resumo, os genes obtidos de bibliotecas de ESTs (MELOTTO et al., 2005) para o mesmo sistema fitopatogênico apresentaram ser realmente responsivos a interação de incompatibilidade entre o feijoeiro SEL 1308 e a raça 73 do *C. lindemuthianum*. Além disso, o perfil transcricional diferencial e específico dos genes contribui para melhor entender as vias de defesa tecido-específica que o feijoeiro utilizaria para conter o crescimento do patógeno antracnose. Em adição, estudos futuros utilizando diferentes técnicas moleculares, bioquímicas e fisiológicas, podem colaborar com o melhor conhecimento sobre a função e os mecanismos moleculares que envolvem os genes estudados na resposta de defesa e desenvolvimento no feijoeiro resistente a antracnose e ainda possibilitar a orientação e seleção de genes com potencial para aumentar a resistência de cultivares suscetíveis de feijoeiro.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D.; GOODMAN, R.M.; GUT-RELLA, M.; GLASCOCK, C.; WEYMAN, K.; FRIEDRICH, L.; MADDOX, D.; AHL-GOY, P.; LUNTZ, T.; WARD, E.; RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogen-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 90, p. 7327-7331, 1993.

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

ALVARADO-GUTIÉRREZ, A.; De REAL-MONROYA, M.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; ALMANZA-SÁNCHEZ, L.; LOZOYA-GLORIA, E.; FRAIRE-VELÁZQUEZA, S.; MELINA, D.M. A *Phaseolus vulgaris* EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against *Colletotrichum lindemuthianum* and by abiotic stress: sequences shared between interacting partners. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 111–121, 2008.

ATKINSON, M.M.; MIDLAND, S.L.; SIMS, J.J.; KEEN, N.T. Syringolide 1 triggers Ca2+ influx, K+ efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease-resistance gene Rpg4. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 297–302, 1996.

BALAGUÉ, C.; LIN, B.; ALCON, C.; FLOTTES, G.; MALMSTROM, S.; KÖHLER, C.; NEUHAUS, G.; PELLETIER, G.; GAYMARD, F.; ROBY, D. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 365-379, 2003.

BERGMANN, C.W.; ITO, Y.; SINGER, D.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; BENHAMOU, N.; NUSS, L.; SALVI, G.; CERVONE, F.; De LORENZO, G. Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors, and fungal infection. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 625–634, 1994.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 29, p. 29-39, 2002.

CASTRESANA, C.; De CARVALHO, F.; GHEYSEN, G.; HABETS, M.; INZÉ, D.; van MONTAGU, M. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* beta-1,3-glucanase gene. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 2, n. 12, p. 1131–1143, 1990.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Cambridge, v. 124, p. 803-814, 2006.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1773–1791, 1996.

HE, J.; YUE X.; WANG, R.; ZHAN, Y. Ethylene mediates UV-B-induced stomatal closure via peroxidase-dependent hydrogen peroxide synthesis in *Vicia faba* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 1-10, 2011. doi:10.1093/jxb/erq431.

HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death**. Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 321–334, 2000.

BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 399–436, 2007.

De LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 313-335, 2001.

De LORENZO, G.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D.; CAPRARI, C.; CLARK, A.J.; DESIDERIO, A.; DEVOTO, A.; FORREST, R.; LECKIE, F.; NUSS, L.; SALVI, G. Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 22, p. 396-399, 1994.

DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Boston, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUMAS, B.; SAILLAND, A.; CHEVIET, J.P.; FREYSSINET, G.; PALLETT, K. Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 316, p. 793-798, 1993.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins. Research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 31, p. 105-124, 2005.

FELTON, G.W.; KORTH, K.L.; BI, J.L.; WESLEY, S.V.; HUHMAN, D.V.; MATHEWS, M.C.; MURPHY, J.B.; LAMB, C.; DIXON, R.A. Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory, **Current Biology**, Oxford, v. 9, p. 317-320, 1999.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; LOZOYA-GLORIA E. Differential early gene expression in Phaseolus vulgaris to Mexican isolates of Colletotrichum lindemuthianum in resistant and susceptible interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 63, p. 79-89, 2003.

GEPTS, P.; ARAGÃO F.J.L.; De BARROS E.; BLAIR, M.W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.J.; GALASSO, I.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; McCLEAN P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PAULS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F.; SPARVOLI, F.; YU, K. Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical**: crop plants. BerlinSpringer, 2008. v. 1, p. 113-143.

GUERRERO-GONZÁLEZ, M.L. Differential expression of *Phaseolus vulgaris* genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, 2011. DOI: 10.1007/s00299-011-1055-5.

JONES, A.; DANGL, J. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 114-119, 1996.

KELLY, J.D.; VALLEJO, V.A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean, **HortScience**, Alexandria, v. 39, n. 6, p. 1196-1207, 2004.

KERVINEN, T.; PELTONEN, S.; TEERI, T.H.; KARJALAINEN, R. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitors. **New Phytologist**, Lancaster, v. 139, p. 293-300, 1998.

KOBE, B.; DEISENHOFER, J. Proteins with leucine-rich repeats. **Current Opinion in Structural Biology**, New York, v. 5, p. 409–416, 1995.

LANGEBARTELS, C.; SCHRAUDNER, M.; HELLER W.; ERNST, D.; SANDERMANN, H. Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: INZE, D.; van MONTAGU, M. (Ed.). **Oxidative stress in plants**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 105‑135.

LANE, B.G. Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. **IUBMB Life**, Boston, v. 53, p. 67-75, 2002.

LANE, B.G. Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, p. 294-301, 1994.

LUCAS, J.A. **Plant pathology and plant pathogens**. Oxford: Blackwell Science, 1998. 288 p.

MADHANI, H.D.; FINK, G.R. The riddle of MAP kinase signaling specificity. **Trends in Genetics**, Maryland Heights, v. 14, p. 151-155, 1998.

MELCHERS, L.S.; W. LAGEWEG, M.H.; STUIVER. The utility of PR genes to develop disease resistance in transgenic crops. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS. SIGNALLING PATHWAYS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES, 5., 1998, Aussois, France. **Abstracts…** Aussois, France, 1998. p. 46.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the Co-1 locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, Wageningen, v. 116, p. 143-149, 2000.

_____. Fine mapping of the Co-4 locus of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 508-517, 2001.

MELOTTO, M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BRUSCHI, A.G.; CAMARGO, L.E. Comparative bioinformatic analisys of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Genome**, Ottawa, v. 48, p. 562-570, 2005.

MELOTTO, M.; BALARDIN, R.S.; KELLY, J.D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). ***Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St Paul, MN: APS Press, 2000. p. 346-361.

MEMBRÉ, N.; BERNA, A.; NEUTELINGS, G.; DAVID, A.; DAVID, H.; STAIGER, D.; VÁSQUEZ-SÁEZ, J.; RAYNAL, M.; DELSENY, M.; BERNIER, F. cDNA sequence, genomic organization and differential expression of three Arabidopsis genes for germin/oxalate oxidase-like proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 459-469, 1997.

MEMBRÉ, N.; BERNIER, F.; STAIGER, D.; BERNA, A. Arabidopsis thaliana germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 345-354, 2000.

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYÈRE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MÖSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 17-27, 1995.

NUSS, L.; MAH É, A.; CLARK, A.J.; GRISVARD, J.; DRON, M.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Differential accumulation of polygalacturonaseinhibiting protein (PGIP) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, p. 83-89, 1996.

OLBRICH, M.; BETZ, G.; GERSTNER, E.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN, H.; ERNST, D. Transcriptome analysis of ozone-responsive genes in leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 670-676, 2005.

PARK, C.J.; KIM, K.J.; SHIN, R.; PARK, J.M.; SHIN, Y.C.; PAEK, K.H. Pathogenesis related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 186-198, 2004.

PASTOR-CORRALES, M.A.; TU, J.C. Anthracnose. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. Cali: CIAT, 1989. p. 77-104.

PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M.; MOLINA, A.; SINGH, S.P. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 1, p. 63-67, 1995.

PETERSEN, M.; BRODERSEN, P.; NAESTED, H.; ANDREASSON, E.; LINDHART, U.; JOHANSEN, B.; NIELSEN, H.B.; LACY, M.; AUSTIN, M.J.; PARKER, J.E.; SHARMA, S.B.; KLESSIG, D.F.; MARTIENSSEN, R.; MATTSSON, O.; JENSEN, A.B.; MUNDY, J. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. **Cell**, Cambridge, v. 103, p. 1111–1120, 2000.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, e36, 2002.

PIETERSE, C.M.J.; van LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defense pathways, **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 52-58, 1999.

RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J.H.; van DE PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 1051-1071, 2003.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 13, p. 62-66, 2003.

RAUSCHER, M.; ÁDÁM, A.L.; WIRTZ, S.; GUGGENHEIM, R.; MENDGEN, K.; DEISING, H.B. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 625-633, 1999.

SASABE, M.; TAKEUCHI, K.; KAMOUN, S.; ICHINOSE, Y.; GOVERS, F.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; YAMADA, T. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitin in tobacco cell suspension culture. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge v. 267, p. 5005–5013, 2000.

SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in Plant Sciences**, Kidlington, v. 7, p. 411-415, 2002.

SCHULTHEISS, H.; DECHERT, C.; KIRÁLY, L.; FODOR, J.; MICHEL, K.; KOGEL, K.H.; HÜCKELHOVEN, R. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, p. 1275-1280, 2003.

SHIPLEY, G.L. An introduction to real-time PCR. In: DORAK, M.T. (Ed.). **Real-time PCR**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. 1-31.

SONG, X.; MA, Q.; HAO, X.; LI, H. Roles of the actin cytoskeleton and an actin-binding protein in wheat resistance against *Puccinia striiformis f. sp. Tritici*. **Protoplasma**, Lipzig, 8p., 2011. DOI: 10.1007/s00709-011-0265-6.

TAMURA, M.; YANAGIHARA, N.; TANAKA, H.; OSAJIMA, A.; HIRANO, T.; HIGASCHI, K.; YAMADA, K.M.; NAKASHIMA, Y.; HIRANO, H. Activation of DNA synthesis and AP-1 by profilin, an actin-binding protein, via binding to a cell surface receptor in cultured rat mesangial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, Gainesville, v. 11, p. 1620-1630, 2000.

THIBIVILLIERS, S.; JOSHI, T.; CAMPBELL, K.; SCHEFFLER, B.; XU, D.; COOPER, B.; NGUYEN, H.; STACEY, G. Generation of *Phaseolus vulgaris* ESTs and investigation of their regulation upon Uromyces appendiculatus infection. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 46, 2009.

van LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135–162, 2006.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.P.; RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

YANG, Y.N.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes & Development**, Woodbury, v. 11, p. 1621-1639, 1997.

YOUNG, R.A.; MELOTTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic resistance in the differential cultivar, G2333. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 87–94, 1998.

YU, I.C.; PARKER, J.; BENT, A.F. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis dnd1 mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 7819–7824, 1998.

ZHANG, J.; ZHOU, J.M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**, Shanghai, v. 3, p. 783–793, 2010.

ANEXO

ANEXO A – Sequências expressas identificadas obtidas a partir das bibliotecas de ESTs desenvolvidas por (MELOTTO et al., 2005).

>PVEPSE3029H20.g – PR1-like protein

```
CTCCTTCATTCTCAAATACATTTCCATCTCTTTAAGGTTCTATCATGGG
TGTTTTCACATTCGAGGATCAAACCACTTCTCCTGTAGCTCCTGCTACC
CTCTACAAAGCTGTTGCTAAAGACGCCGATACCATCTTCCCAAAGGCTC
TTCCTGATTCCTTCAAGAGTGTTGAAATCGTTGAGGGCAACGGTGGCCC
CGGAACCATCAAGAAGATCTCTTTCGTTGAGGATGGAGAGACAAAATTT
GTGTTGCACAAAATAGAATCAATAGATGAGGCCAATTTGGGATACAGCT
ACAGCATAGTTGGAGGTGTTGCCTTGCCAGAAACTGCAGAGAAGATCAC
TTTCGACTCCAAACTCAGTGATGGTCCTAACGGAGGATCACTCATTAAG
CTGAGTATAACATACCACAGCAAAGGAGATGCTCCACCCAATGAAGATG
AACTCAAAGCTGGAAAAGCCAAGAGTGATTCTCTTTTCAAGGCCGTAGA
GGCATACCTTCTGGCCAATCCCTGATTACAACTGATTCAATTGAGTTAT
CGATATCAGTCAGTAACA
```

>Contig186 – Pathogenesis related protein-1

```
TGCTTCCTTTGGTAGCGATCCTTTTACCCACATCAACACTGTCTCAAATTTGTGATGCAC
AAAACTCACCCCAAGACTTCCTCAACGCTCACAACACTGCGCGTTCCCAAGTTGGGGTAG
GACCAATTAGATGGGATGCAACAGTAGCTTCTTTTGCACAAAACTACGTGAACAAACTAA
AGGGTAACTGCAAGATGGTGCACTCTGGGGGTCCTTATGGGGAGAACCTTGCGTGGAGCA
GTGGTGACCTCACAGGCACAGCTGCTGTGAAGCTGTGGGTGGGAGAGAAGCCACACTATG
ATTACAACTCCAACAGCTGCGTTGGTGGAGAGTGCAGACACTACACTCAGGTGGTGTGGC
GCAACTCGGTGCGTCTTGGTTGTGCTAAAGTGCGCTGCAACGACGGTCGTGCCACCATCA
TCAGCTGCAACTATGATCCACCAGGGAACTATATTGGTCAGAGGCCTTTCGATATTAGTC
CCTTCCAAGTACCTTTGAGCTTTAATAAACGTGTGGATCATAATATGTGAAGCCACGTTG
TTGGAATAAAATAAATGTATTGCTACCAGTTCTGCATATATTTGTTTATATGCAGAATCG
CGTGCCAGCTTCAGCTGTATCACTTATGCTAAAAAAATGTGTTTTATCGCTGAGTTAACT
GGTTTTCATGGCTCTCTC
```

>Contig458 - 1,3-beta-D-glucanase

```
CCTTATTCACTTCACCATTTTGTGGTGTGTTATAATTTTCCACCATGGCTTCTCAGTTCC
CCAGAAACCAGAGGTTCTCATTTGCTGCTTTCCTTCTTCTTTTTCAACTATTCACACTAA
ACCTTATCACAACAGATGCTCAAATCGGGGTGTGTTATGGCATGATGGGCAACAATCTCC
CATCAGCCAATGAAGTTATAAACCTTTACAGATCAAACAACATAAGAAGAATGAGACTTT
ACGATCCCAATCAAGCAGCTCTGCAAGCACTCAGAAACTCAGGCATTGAACTCATTCTTG
GAGTGCCAAACTCTGATCTTCAGGGTCTTGCCACCAATGCCGACACTGCTCGTCAATGGG
TGCAAAGGAACGTGCTGAACTTTTGGCCCAGTGTTAGAATCAAGTACATAGCAGTTGGCA
ATGAAGTGAGTCCTGTTGGAGGTTCCTCTTGGTATGCCCAATATGTTCTACCTGCTGTCC
AAAATGTATACCAAGCTATAAGGGCTCAAGGCCTCCATGATCAAATCAAGGTTTCAACAG
CCATTGACATGACCCTTATAGGAAACTCCTACCCTCCATCACAAGGTTCCTTCAGGGGTG
ATGTTAGATCATACCTAGACCCTATAATAGGGTACTTGCTATATGCAAGTGCACCTTTGC
TAGTGAATGTGTACCCTTATTTCAGTTACTCTGGCAATCCTCGTGATATATCACTTCCCT
ATGCTCTTTTCACTTCACCAAATGTTGTGGTGAGGGATGGCCAATATGGGTACCAAAATC
TGTTTGATGCTATGTTGGATTCAGTGCATGCAGCCATTGATAACACTAGGATTGGTTACG
TGGAGGTGGTTGTGTCTGAGAGTGGGTGGCCCTCAGATGGAGGGTTTGGTGCCACGTATG
ACAACGCACGTGTGTACTTGGATAACTTGGTTCGTCGTGCTGGAAGAGGAAGCCCTAGAA
GGCCTTCGAAGCCTACAGAGACTTATATATTTGCCATGTTCGATG
```

>Contig199 - Germin-like protein 8
TTTCACACTACCAAGTTAAGATGTTTCTCCAAATTGTCTTCCTCCTTTCCTTTCTCTTAT
CCACTTCCCATGCTACTGTTCAAGACTTCTGTGTGGCAGACCTCAAAAGTGCAGATGGCC
CTGCAGGCTTTCCCTGCGTGCCACCTGCCAAAGTTACTTCAGATGACTTTGTGTTTGCTG
GCTTATCTGAAGCTGCAAATGTCACAAACATAATCAATGCTGCTGTGTCCCCTGCATTTG
TTGGTCAATTTCCAGGTGTTAATGGTCTTGATCTCTCTGCAGCAAGGTTAGACCTTGGTC
CTGCAGGAGTTATACCACTGCACACTCATCCTGGTGCCAATGAACTTCTAATAGTGAACC
AGGGTCACATCCTCGCTGGATTCATATCATCAAGTAACGTTGTTTATCAGAAGGTACTCA
AAAGGGGAGAGCTTATGGTCTTCCCACAAGGATTGTTGCACTTTCAAATAGCAGCTCACA
AGAGGAAGGCCATTGCTTTTGCTGTTTTCAGCAGTGCAAACCCTGGCCTCCAAATCCTTG
ACTTTGCACTCTTTGCCAGCAACTTCTCCACACCTTTGATCGCACAGACTACTTTCCTTG
ACCCT

>Contig202 - Germin-like protein10
CACAAACATCATCAACAATGAAGATAGTTGTAACCCTCATCTTGAGTTTATCCCTGCTCT
CTCTCTCCCACGCTTCTGTGGTAGATTTCTGTGTGGCAGATTACACAGCTCCCAATGGCC
CTGCAGGCTACTCATGCAAGAACCCTGCAAAGGTGACAGTGAATGACTTTGTCTACTCTG
GCCTTGCCACTGCTGGCAACACCTCAAACATCATCAAAGCTGCAGTGAGTCCAGCATTTG
ATGCTCAATTCCCTGGTGTCAATGGCCTTGGAATTTCTGTTGCACGTTTGGACTTGGCTT
CTGGTGGGGTCATCCCACTCCACACACACCCTGGAGCCTCAGAACTGTTGGTTGTAGTAG
AGGGTCAAATCTGTGCTGGATTCGTTGATTCTGGCAACAATGTGTACCTCAAAACCCTCG
AAAAGGGTGACATCATGGTGTTCCCTCAGGGCTTGTTGCACTTCCAAATCAACTCTGGTG
ACTCTCAGGGTTTAGCTTTTGTTAGCTTCAGCAGTGCCAACCCTGGCCTGCAGATTCTGG
ACTTTGCCCTATTCAAGAGTGACTTCCCCACTGAACTCATCACCGAAACCACTTTCATTG
ATGCTGCTGTGGTGAAGAAGCTGAAGGGTGTTCTTGGAGGGTCAGGTTAAATTGATTTAT
GCATGAAAAAAGATAGGAGTATGTGCTCAGGAGTTGTGTCATTTTTGTTCAATTTGATTA
TTTGTGTGGATTTCGTTTTGCATGTAAAACCATGTTCTTCTACTTTAGCAGGCTTTGTTA
ACC

>PVEPSE3010D06.g – Polygalacturonase inhibitor-like protein
CTTCAACTCGTGGACCGGCGCCGACTGCTGCCACAACTGGTACGGCGTG
AGCTGCGACCAGGTAGACCCGCCGCGTTGCGGACATCAGCCTCCGCGGC
GAGTCGGAGGAGCCGATCTTCGAGCGGGCGCACCGGACTGGCTACATGA
CCGGCTACATCTCCCCGGCGATCTGCAAGCTCGCGCGGCTCTCCAGCAT
CACCATCGCGGACTGGAAGGGAATCTCCGGGGAGATTCCTCGCTGCATC
GCGGCCCTGCCGTTCCTCCGCATCGTCGACCTCATCGGAAACCGCATCT
CCGGCAGCATCCCCGCGGACATCGGCAGGCTCCACCGCCTCACGGTGCT
GAACATCGCCGACAACCGCATCTCCGGCACGATCCCGGCGTCGCTCGCG
AACCTCACGAGTCTCATGCACTTGGATCTCCGTAACAACCTCCTCTCCG
GGCCCATTCCGAGGCACTTCGGTTCTCTCCGAATGCTGAGCCGGGCCTT
GCTCAGTGGAAACCGCCTTAGCGGGCCCATCCCGGGCTCCGTTTCACTC
ATTTACCGTCTGGCGGATCTGGATCTGTCTCGCAACCAACTTTCCGG

>Contig413 – Polygalacturonase-inhibiting protein
GAAATCATTATCAATATCTTTTACATTATGTGACAGAGAAGCTTGCATACAAAACAAGAA
TAATTTTGAAATTAGCTTCAGCTTTTCATCAAAACATGAATTCCTTCCTTCAAAACCCTT
GTTCTGTTGTGCACGTGATCTCAAACTGCATCAACATCACTTCTTTTTCTTTTTGTCCCT
TTCATCTTTCTCACTACAACATTATATTACACCACTTAAAAAACAAACACCGAAACATTT
TACTATTACACCAAAATTCACACTTGTATCCATAATCGAATCGGGTACTTAATCGGGTCA
CCCGCAATAACTAGCAAGTCTTCAACGGGTTCCCACACAAGCAATCGTTGAACCCAAACG
ACGACGCTTCAAGGTGATCAAAGGGTTCTCCCACAGGAATGGATCCGCACAGATGGTTGT
GACTGAGATCCAAATGCCCGATATATTTGGCGGATGCCAAGGATTCGGGTACCCGACCCT
TTAAATTGTTGTAAGACAAATCCAAAGCCATGAAATAGGAGTGTGACCCGAAAACATCGG
GTATGGATCCTTCGAACCCGTTTCGGCTAAGGTTCAAAATACCCATTCCGCCGTTGCTCA
ACAAACTCTCGGGGATTAAACCCTTGAGAGAGTTGCTATCCAGATTAAGCACGGAAAGAA
CCGGCATTTTGCCAAGCTCAAACGGAACCGAACCGGTCAAGCGGTTCACGGACAGGTCCA
AGTCCGCGAGCCGGTAAATCTTGGAAATCG

>Contig535 – Phenylalanine ammonia-lyase 2
CAATTCCCAACAAGATCAAGGATTGTAGATCTTACCCCTTGTACAAGTTTGTGAGAGAGG
AGTTAGGGACATCGTTGCTGACTGGTGAAAAGGTGATCTCACCGGGTGAAGAGTGTGACA
AAGTGTTCAGTGGCTATTTGTGCCAAGGAAAAATCATTGATCCTCTCTTGGAATGCCTTG
GAGAGTCGAATGGTGCTCCTCTTCCAATTTGTTAGTTCGTCATTTTATGTTTATTGGAGA
GTGGTTTCTTTCTATATACGTATTTGTGTTGATAAGAATTTGGTTTGTCTGTAAGCCTGT
GGCAAATCAATCCACATACAACTTTTCAGGCTTCCTTGATGTCAAGGAACGTGTAATTCA
TATTGTAATAGAATTCCATTTGTTTGCCATAGCTTTGAGTGCAACTGTTAATACATGCCT
TCCATGTGAAGGATGTTTTCTCATG

>PVEPSE3028E14.g –MEK map kinase kinase
CGCAGGAGCAGCAGCTGGCAGATCTGTCCAGGCAGATTCTGCGGGGGCT
GGCGTATCTGCACCGGCGGCACATCGTGCACCGCGACATCAAGCCCTCT
AATCTGCTGATAAACTCGCGCAAGCAGGTGAAGATTGCGGACTTCGGCG
TGGGTCGGATTCTGAACCAGACCATGGATCCGTGCAATTCGTCGGTGGG
AACGATCGCCTACATGAGTCCCGAGAGGATCAACACGGACATAAACGAC
GGGCAATACGACGCCTACGCCGGCGACATATGGAGCTTTGGGGTTAGCA
TATTGGAGTTCTACATGGGCAGGTTTCCCTTCGCTGTGGGGAGGCAAGG
CGATTGGGCCAGCCTCATGTGTGCCATCTGTATGTCTCAGCCGCCGGAG
GCTCCTCCTTCTGCCTCCCTCCACTTCAGGGATTTCATCTCCCGGTG

>Contig514 – Ultraviolet-B-repressible protein
CATTTCACTTTCCTCACTTTTCAAACAAGTTTCACCGGAGTAAGCAACTTGCAGGGGAAA
GGAATGGCTTCAACTTCAGCACTTTCAATGTCTCTCCCACTAAATCACACCACCCAGAAG
AGGGTGGTGCCCACTTCCGAGGCACTGTTCAAGGCACCGTTAACTCTGCCAGCTTCAAAG
GGTGTGGCACTGTCCAAACCCAATGGAAGGTTTCAGGTGAGGGCATCCATGAAAGAGAAA
GTTGTCACGGGTTTGACTGCAGCTGCTTTGACGGCTTCCATGATGGTTCCCGATGTGGCT
GAAGCCGCCGTATCGCCTTCTCTCAAGAATTTCTTGCTCAGCATCGCCGCTGGTGGAGTT
GTGGCTGTAGCAATTGTTGGCGCCGTCATTGGGGTTTCCAACTTCGATCCCGTCAAGCGA
AGCTGAGAACTTTTCTAGAATTTCTCTTGTCACCCTATGCATCTGTGTTCTTCACTGTCG
AACTCTCTCTCTTTTGTAATATGTGATTATCTCCCTTTGAGCAGAATCCAATTCTTACAA
TGTAATGAATCATTTTGACGTATCTTAAAAACATCTTTATTGCT

>Contig378 - Profilin
TCTCAACCCATTTTCAGAGAGAAGCAAAGCACAGTGAGTTTGGTGAGAAAATCAGAAGCA
TGTCGTGGCAAACGTACGTCGACGACCACCTTCTCTGTGAGATCGAAGGTAACCACCTCA
CTCACGCCGCCATCCTCGGCCAAGACGGCAGCGTTTGGGCTAAGAGCGCCAGCTTCCCTC
AGTTCAAACCGGAAGAAATAACTGGGATCATGAATGATTTTAATGAGCCTGGAACACTTG
CTCCTACTGGATTGTACATTGGTGGCACTAAATATATGGTCATCCAAGGTGAACCCGGCT
CTGTCATTCGAGGCAAGAAGGGTCCTGGTGGTGTTACTGTGAAGAAGACGAATCTGGCCT
TGGTGATAGGCATTTATGATGAACCCATGACTCCAGGTCAATGCAACATGATAGTTGAAA
GGCTTGGTGATTATCTCATTGAACAGGGTCTCTAATGCCCTTGTTATGATTGGTTATAGT
GCATATTTCATTGGCTTCTGTTCCCGTTTTT

>Contig435 – Cyclic nucleotide-gated ion channel
TGATCCTGTACCAAGGATGATGTTCATCGTCCGAGGACGCATAAAGCGCAGCCAAAGTCT
GAGCAAAGGCATGGTAGCCTTAAGCATCCTTGAGCCAGGAGGGTTTTTGGGTGACGAGCT
ACTTTCATGGTGCCTTCGCCGGCCATTTATAGATAGACTTCCGGCCTCCTCAGCCACATT
TGTGTGTCTTGAATCAGCAGAAGCCTTTGGCCTTGATGCAGAGCACTTGAGGTACATCAC
TGATCACTTCAGGTACAAGTTTGCCAACGAGAGGCTGAAGAGAACAGCAAGATATTACTC
ATCCAATTGGAGAACCTGGGCTGCTGTCAACATTCAATTTGCTTGGAGACGTTACAGGCA
GAGGACTAGAGGTCCAGTGACGCCTGTAAGGGAGATTGGAGGGACTGAGCGCAGGCTCTT
ACAATATGCTGCAATGTTCATGTCAATAAGGCCACATGACCATCTTGAATGAAAGCTGCT
GTCTATGTTTTTCAATTTTTTATTGCTTCCTGGCCTTCAATAAAACTGTCTCAAGTCCAT
TAAACCTTATGATTTTTTAAGTTGTTGTGGAAGCCATGGAATCATCGATGAAATTTATAA
AAGAAAGCATGCGTAATTGC