



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio

Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Identificação de marcadores e caracterização
de mecanismos moleculares associados à
resistência à ferrugem da folha em trigo.**

Tese de Doutorado

Paulo Roberto Da Silva, M.Sc.

Porto Alegre

Dezembro de 2006



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio
Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Identificação de marcadores e caracterização de
mecanismos moleculares associados à resistência à
ferrugem da folha em trigo.

Paulo Roberto da Silva

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular
e Molecular da UFRGS como um dos
requisitos para a obtenção de
grau de Doutor em Ciências.

Orientação: Sandra Cristida Kothe Milach, Ph.D

Co-Orientação: Luiz Carlos Federizzi, Ph.D

Sandra Patussi Brammer, Dr.

Porto Alegre
Dezembro de 2006

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Faculdade de Agronomia

Departamento de Plantas de Lavoura

EMBRAPA - Trigo

CNPq/PADCT

CAPES

Dedico às minhas fantásticas irmãs,

Maria Regina,

Márcia Cristina e

Ana Cláudia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre iluminou meus passos e pensamentos.

A minha orientadora, Prof^ª Sandra Milach, pela orientação e amizade.

Ao Prof^º Luiz Carlos Federizzi e Dr^ª. Sandra Brammer pela Co-orientação.

A Dr^ª Márcia Soares Chaves pela grande ajuda nas inoculações.

A Prof^ª Carla Andréa Delatorre pelos ensinamentos em fisiologia vegetal.

Aos Professores Arthur Fett-Neto e Janette Palma Fett, pelo acompanhamento no decorrer do doutorado.

A Professora Janette Palma Fett, pela revisão desta Tese.

Aos Professores do Centro de Biotecnologia e da Faculdade de Agronomia, da UFRGS, pelos ensinamentos.

A minha ex-orientadora Maria Suely Pagliarini, por ter me iniciado na carreira científica.

A Silvia (Mimosa) e Luciano pela eficácia e paciência no atendimento.

A meus familiares, Ana Julia, José Expedito e Ana Claudia; Marcia e Paulo; Maria Regina, Carlos, Heloísa e Kenzo, pelo amor e compreensão.

Aos meus primeiros co-orientados de Iniciação Científica, Vinícius, Fernando e Diva, que tiveram um papel importante no desenvolvimento desta Tese.

Aos colegas do laboratório pela amizade e pelo apoio prestado ao longo deste trabalho: Adriano, Adrianinho, Fábio, Jonathan, Mércio.

As incríveis mulheres do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia, Ana, Carol, Franceli, Fabiane, Ingrid, Josana, Noryam, Tati Terra, Paula.

Em especial as amigas Dani, Laize e Tati e ao amigo Emerson pelo excelente convívio e pela amizade.

Aos amigos da Liga do “Xis”, Adriano Silvério, Julio Cesar, Anderson Machado, Rafael e Érica Duarte.

A todos meus amigos e ex-professores da Universidade Estadual de Maringá - PR, que mesmo longe sempre me apoiaram. Em especial a Creucí, Eleniza, Neide e Onildes, amigas do coração.

ÍNDICE

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
CAPÍTULO I	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
História e importância econômica do trigo	16
A ferrugem da folha	18
Resistência a doenças	20
Melhoramento para resistência à ferrugem da folha	26
Seleção assistida por marcadores moleculares	28
Abordagens de estudo do genoma do trigo	29
Mecanismos moleculares da interação planta-patógeno	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
OBJETIVOS	46
CAPÍTULO II	47
Validação de marcadores PCR-específicos para seleção assistida em programas de melhoramento de trigo no Brasil	
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAIS E MÉTODOS	50
Material vegetal	50
Extração do DNA	50

Obtenção dos marcadores PCR-específicos e PCR.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO III	60
Identificação de seqüências genômicas em linhagens diferenciais de trigo potencialmente associadas à resistência à ferrugem da folha	
INTRODUÇÃO.....	61
MATERIAIS E MÉTODOS	64
Material vegetal	64
Extração de DNA e AFLP.....	64
Identificação de fragmentos de interesse, clonagem e seqüenciamento	65
<i>BLAST search</i> , mapeamento <i>in silico</i> e mapeamento físico.....	66
Avaliação do potencial das seqüências identificadas como marcadores moleculares	67
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
AFLP.....	68
Mapeamento e <i>Blast search</i>	69
Análise do potencial do uso dos SCARS desenvolvidos como marcadores moleculares	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO IV	78
Identificação e caracterização de análogos a genes de resistência em trigo	

INTRODUÇÃO.....	79
MATERIAIS E MÉTODOS	82
Material vegetal	82
Extração de DNA e RNA e síntese de cDNA	82
<i>Data mining</i> e desenho de <i>primers</i> degenerados	83
PCR, clonagem e seqüenciamento	84
<i>BLAST search</i> , identificação de motivos e análise filogenética	86
Mapeamento e avaliação do potencial dos RGAs como marcador molecular	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
PCR e construção de mini-bibliotecas	88
Identificação de motivos	89
<i>Blast search</i> e análise filogenética	93
Mapeamento e avaliação do potencial das seqüências identificadas como marcador molecular	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
 CAPÍTULO V	 106
Caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo	
INTRODUÇÃO.....	107
MATERIAIS E MÉTODOS	109
Material vegetal, inoculação e coleta	109
Extração de RNA, síntese de cDNA, construção da biblioteca	

e seqüenciamento	110
Análise <i>in silico</i> das seqüências	111
RT-PCR semi-quantitativo	112
RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
Construção e caracterização da biblioteca de resistência à ferrugem da folha	113
Caracterização funcional	113
Sinalizadores primários da presença do patógeno, possíveis genes de resistência.....	116
Sinalizadores secundários, amplificação de sinais para ativação de resistência sistêmica adquirida	119
Ativação de rotas envolvidas na expressão de resistência sistêmica adquirida	122
Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR semi-quantitativo	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
CAPÍTULO VI	133
DISCUSSÃO GERAL	133

RESUMO

Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo

Autor: Paulo Roberto Da Silva

Orientadora: Sandra Cristina Kothe Milach

Co-orientadores: Sandra Patussi Brammer e Luiz Carlos Federizzi

A ferrugem da folha é a doença que causa maiores prejuízos à triticultura. A resistência genética é comprovadamente o método mais eficiente e econômico de controle. Em trigo, a resistência à ferrugem da folha pode ser específica à raça e não específica à raça. Atualmente a melhor estratégia para manter uma proteção efetiva contra a ferrugem da folha consiste em empregar combinações de genes, independente do tipo de resistência que conferem. A piramidização de genes é facilitada com o uso de marcadores moleculares. Os mecanismos moleculares de resistência dos genes que conferem resistência específica à raça têm sido amplamente estudados, no entanto da resistência não específica à raça pouco se sabe. Assim, este projeto teve como objetivos: I) validar marcadores moleculares para seleção assistida para a resistência à ferrugem da folha em genótipos brasileiros de trigo; II) identificar marcadores moleculares potencialmente associados a genes de resistência não específica à raça à ferrugem da folha; III) identificar e caracterizar análogos a genes de resistência em trigo; IV) caracterizar mecanismos moleculares da resistência não específica à raça a ferrugem da folha em trigo. Para a validação foram avaliados cinco marcadores PCR-específicos associados aos genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* e *Lr24*. Os marcadores associados aos genes *Lr9*, *Lr10* e *Lr24* apresentaram potencial para uso na seleção assistida, pois foram específicos para plantas contendo estes genes. Para a identificação de RGAs foram utilizadas três combinações de primers degenerados. A maioria das seqüências apresentou os motivos comuns a genes de resistência. Uma seqüência apresentou alta homologia com genes de resistência previamente identificados. Os primers derivados das seqüências identificadas apresentaram alto polimorfismo, sendo que um destes mostrou-se associado ao gene *Lr26* e a resistência de planta adulta à ferrugem da folha. A combinação da técnica de AFLP com linhagens diferenciais contrastantes para os genes *Lr13* e *Lr34* permitiu identificar duas seqüências potencialmente associadas ao gene *Lr34*. O uso da SSH permitiu identificar genes diferencialmente expressos na resistência não específica à raça à ferrugem da folha no cultivar Toropi. Dentre as seqüências identificadas estão genes codificadores de proteínas de membranas potencialmente associados à percepção do patógeno e genes com domínios característicos de sinalizadores secundários para a resistência como *NPR1*, *Rar1*, *Sgt1* e calmodulina. Além destas, foram identificados também seqüências com homologia a genes codificadores de enzimas chaves no controle de rotas de síntese de substâncias relacionadas à defesa e envolvidas no metabolismo primário, principalmente produção de energia. Os marcadores e seqüências obtidas e mecanismos elucidados neste trabalho representam ferramentas valiosas para a obtenção de cultivares de trigo com resistência ampla e durável à ferrugem da folha.

ABSTRACT

Molecular markers and mechanisms associated to the leaf rust resistance in wheat.

Author: Paulo Roberto Da Silva

Advisor: Sandra Cristina Kothe Milach

Co-advisors: Sandra Patussi Brammer and Luiz Carlos Federizzi

Leaf rust is one of the most important wheat diseases worldwide. The genetic resistance is the most efficient and economical method to leaf rust control. Host resistance to leaf rust can either be race-specific or no race-specific. The best strategy to maintain an effective protection against leaf rust consists in resistance gene combinations, independent of the resistance type. Marker-assisted selection greatly facilitates gene pyramiding. The molecular mechanisms of race-specific resistance genes have been well studied, however there is little known about the no race-specific resistance gene mechanisms. The objectives of this project were: I) to validate molecular markers for marker-assisted selection to leaf rust resistance genes in Brazilian wheat cultivars; II) to isolate and characterize resistance gene analogues (RGAs) in wheat; III) to identify molecular markers potentially associated to leaf rust no race-specific resistance genes; IV) to characterize molecular mechanisms from no race-specific resistance genes to leaf rust in wheat. Five PCR-specific markers previously identified as associated to the *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* and *Lr24* genes were evaluated. The markers associated to the *Lr9*, *Lr10* and *Lr24* genes were specific to the cultivars carrying them in the Brazilian wheat cultivars, demonstrating potential for marker-assisted selection. Three degenerate primer combinations were used for the RGAs identification and most of the identified sequences showed the conserved motifs from resistance genes. One sequence showed high homology with previous identified plant resistance genes. The primers from identified sequences showed high polymorphism, and one of these is associated to the *Lr26* leaf rust resistance gene and to the adult plant resistance present in cultivar BR35(?). The use of AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique with near-isogenic lines carrying *Lr13* and *Lr34* genes from wheat cv. Thatcher allowed to identify two sequences potentially associated to the *Lr34* gene. SSH were used to identify leaf rust induced genes from no race-specific resistance wheat cultivar Toropi. Among the identified sequences there are proteins of membranes for genes potentially associated to the pathogen perception and genes with secondary signals resistance domains as *NPR1*, *Rar1*, *Sgt1* and calmodulin binding protein. Besides these, we identified sequences with homology to genes for key enzymes in the control of the related defense substances synthesis and involved in the primary metabolisms, mainly energy production. The markers and sequences obtained and the mechanisms elucidated in this work represent a valuable tool for the development of wheat cultivars with more reliable resistance to leaf rust.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell) é originário das regiões secas e temperadas da Mesopotâmia e Europa. Sua domesticação ocorreu nas lavouras primitivas do Sudeste da Ásia de 7000 a 9000 a.C. Este cereal é fonte de 20% do total de calorias consumidas pela humanidade e tem se destacado mundialmente como a segunda cultura em produção de grãos, sendo superada apenas pelo milho.

No Brasil, o trigo foi introduzido no ano de 1534, na Capitania de São Vicente. Por ser de regiões de clima seco e temperado, o trigo apresenta problemas de adaptação às condições agro-ecológicas sul-brasileiras, sendo a alta incidência de doenças um dos fatores limitantes ao cultivo. Dentre as doenças que causam maiores prejuízos na triticultura brasileira está a ferrugem da folha do trigo ou ferrugem marrom, que é causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss. As epidemias de ferrugem da folha nas lavouras tritícolas do Brasil têm sido um dos fatores críticos nas frustrações da produtividade, contribuindo para a redução da área cultivada, instabilidade das colheitas e aumento da evasão de divisas devido à necessidade de importação do produto.

O controle de doenças fúngicas para evitar grandes perdas de produção tem sido feito com o uso de produtos químicos. Isso leva a um aumento considerável do custo de produção, além de envolver riscos para a saúde humana e animal e para o equilíbrio ecológico. Diante disso, a resistência genética é o método mais eficiente e econômico de controle.

O tipo de resistência mais comumente utilizada é aquela conferida por genes de efeitos maiores no fenótipo, que conferem resistência específica à raça. Entretanto, esta tem se mantido efetiva por um período muito curto, em função da alta pressão de seleção existente sobre o patógeno, o que leva a uma rápida superação da resistência. A utilização da resistência não específica à raça, conferida por genes de efeitos menores no fenótipo, é uma alternativa para esse problema, uma vez que esse tipo de resistência permite a sobrevivência do patógeno, interferindo negativamente na sua taxa de desenvolvimento e reprodução. A pressão de seleção que a resistência parcial exerce sobre o patógeno é menor, tornando-a promissora para a obtenção de resistência durável.

Atualmente a melhor perspectiva do melhoramento para controle da ferrugem da folha consiste em empregar combinações de genes, independentemente de serem de efeitos maiores ou menores no fenótipo. No entanto, a piramidização de genes torna-se difícil, principalmente porque os efeitos dos genes individuais não podem ser facilmente identificados. Nesse sentido o uso de marcadores moleculares para identificar e manipular segmentos cromossômicos controlando o caráter de interesse, pode aumentar a eficiência da seleção. Isso possibilitará ao melhorista selecionar os caracteres de interesse com base no genótipo e não no fenótipo, o que é especialmente importante na piramidização, pois a presença de um gene ofusca o efeito do outro tornando a avaliação fenotípica pouco precisa. Desta maneira a identificação de marcadores associados a genes de resistência à ferrugem da folha e a validação de marcadores já existentes é de extrema importância, pois estes permitirão a

piramidização destes genes e, conseqüentemente a obtenção de cultivares de trigo com resistência durável de maneira mais rápida e precisa.

Paralelamente ao desenvolvimento de marcadores moleculares associados a genes de interesse, é importante o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência não específica à raça. Além de estarmos avançando cientificamente no entendimento dos mecanismos moleculares da interação planta patógeno, a identificação de genes chave no desencadeamento da resistência não específica à raça possibilitará uma aplicação direta no melhoramento genético, seja para o desenvolvimento de marcadores funcionais ou mesmo uso destes pela engenharia genética para o desenvolvimento de novos cultivares com resistência não específica à raça à ferrugem da folha e, conseqüentemente, durável.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

História e importância econômica do trigo

As espécies do gênero *Triticum*, com número cromossômico básico de sete, apresentam diferentes níveis de ploidia, incluindo espécies diplóides ($2n=14$, genoma AA), tetraplóides ($2n=28$, genomas AABB) e hexaplóides ($2n=42$, genomas AABBDD). Atualmente, as espécies cultivadas em grande escala são o trigo duro tetraplóide *Triticum turgidum* L. e o trigo de panificação hexaplóide, *Triticum aestivum* L. em Thell.

O trigo de panificação (*Triticum aestivum* L. em Thell) ($2n=6x=42$) é uma espécie anual, hermafrodita e autógama. É uma das culturas de maior expansão mundial, possuindo milhares de cultivares disponíveis em todo o mundo. A domesticação do trigo ocorreu nas lavouras primitivas do Sudeste da Ásia de 7000 a 9000 a.C. (BELL, 1987) e esse foi introduzido na Índia, China e Europa em 500 a.C. É uma das espécies mais estudadas, em nível mundial, do ponto de vista científico, tecnológico e econômico. Apesar disso, no Brasil são poucos os grupos que se dedicam a desenvolver trabalhos científicos com esta cultura.

Este cereal é fonte de 20% do total de calorias consumidas pela humanidade e, comprovadamente, o alimento básico da civilização ocidental (ANGRA, 1995).

Com o início do melhoramento genético as modificações em rendimento, qualidade de panificação, arquitetura da planta e aumento da resistência aos estresses bióticos e abióticos foram impressionantes. Atualmente, existem

genótipos de trigo cultivados desde o Equador até 60° de latitude. O número total de acessos em bancos de germoplasma, no mundo inteiro, é estimado em 400.000 entradas, embora possa haver duplicações.

O trigo é segunda cultura em produção de grãos, sendo superado apenas pelo milho (FAO, 2006). A produção mundial foi de 626,8 milhões de toneladas em 2004, sendo os países asiáticos os líderes em produção (264,1), seguidos da Europa (204,9), Estados Unidos (82,7) e América do Sul (20,0). A Argentina é o maior produtor de trigo da América do Sul, contribuindo com 60% da produção (cerca de 12 milhões de toneladas), seguido do Brasil que produziu 4,8 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2006). As produtividades médias no Brasil cresceram consistentemente nas últimas décadas.

Sendo uma das primeiras culturas introduzidas no Brasil, no ano de 1534, na Capitania de São Vicente, o trigo teve, desde então, seu consumo destinado, quase que exclusivamente, à panificação e à fabricação de massas alimentícias. As necessidades atuais são, preferencialmente, de trigos com qualidade de panificação superior, os quais têm mercado assegurado (BRAMMER, 2000). O consumo industrial de trigo varia conforme as regiões brasileiras, concentrando-se principalmente no Sudeste (52%) seguido pelo Nordeste (22%), Sul (19%), Centro-Oeste e Norte (3%). Quanto ao consumo *per capita*, destaca-se a região Sul, com 64 Kg de trigo ao ano, enquanto que nas regiões Centro-Oeste e Norte esse é de 23 Kg. Apesar dos esforços das instituições brasileiras de pesquisas de trigo visando aumentar a produtividade deste cereal, grande parte do consumo interno não é suprido pela produção nacional. O balanço entre a oferta e a demanda deste cereal no Brasil é desfavorável, implicando na importação massiva do produto, principalmente vindo da Argentina (CONAB, 2005). Estima-se que em 2005, foram gastos 854 milhões de dólares na importação de cereais, farinhas e preparados. Deste montante, 649 milhões de dólares (76%) corresponderam à importação de trigo, sendo este um forte contribuinte para o déficit na balança comercial brasileira (MAPA, 2006).

Investimentos no melhoramento varietal têm sido uma das mais importantes estratégias para aumentar e estabilizar a produtividade, considerando a necessidade de auto-suficiência, tendo em vista seu papel central para a

sustentação dos sistemas de produção de grãos e para o desenvolvimento sócio-econômico do país.

A ferrugem da folha

O trigo apresenta problemas de adaptação às condições agro-ecológicas sul-brasileiras tendo em vista que a sua cultura originou-se nas regiões de clima seco e temperado da Mesopotâmia e Europa (ANGRA, 1995). Por esta razão, a cultura é atacada por inúmeras doenças e pragas, exigindo da pesquisa um maior esforço para superá-las, principalmente quando comparado ao dos países do hemisfério norte.

As epidemias de doenças fúngicas nas lavouras tritícolas do Brasil têm sido um dos fatores críticos nas frustrações da produtividade, contribuindo para a redução da área cultivada, instabilidade das colheitas e aumento da evasão de divisas devido à necessidade de importação do produto. Dentre as doenças fúngicas que causam maiores prejuízos à triticultura brasileira, está a ferrugem da folha do trigo ou ferrugem marrom que é causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss (ANIKSTER et al., 1997). Como os demais fungos causadores de ferrugem, *Puccinia triticina* caracteriza-se por ser um parasita obrigatório e apresentar uma alta especialização fisiológica. Este fungo é capaz de colonizar a região intercelular dos tecidos vegetais e produzir haustórios, que retiram nutrientes diretamente da célula viva. Esse resgate de nutrientes pelo fungo, acompanhado da redução da área foliar, em decorrência da formação de pústulas, afeta o processo de fotossíntese da planta (SIMONS, 1985).

A infecção do trigo pelo fungo inicia-se quando o esporo entra em contato com a planta e encontra condições propícias para sua germinação, sendo que a

condição mais importante é a umidade, havendo a necessidade de que um filme de água cubra o esporo para que a germinação ocorra (HEATH, 1997). Quando depositados na planta, os uredósporos de muitos fungos das ferrugens respondem às características topográficas da superfície da folha, através do desenvolvimento do tubo germinativo, que cresce em direção ao estômato, que é reconhecido pelo sulco presente em sua superfície. O tubo germinativo diferencia-se em uma estrutura chamada apressório e ocorre a penetração das estruturas do fungo no tecido da planta. Após a penetração, a colonização do tecido hospedeiro pode ser facilitada pela produção de fitotoxinas ou de análogos de hormônios vegetais, que alteram a fisiologia das plantas em favor do patógeno (HEATH, 1997).

A dispersão dos esporos da maioria dos fungos ocorre principalmente pelo vento, meio pelo qual os esporos das ferrugens também são transportados, alcançando, geralmente, grandes distâncias. As condições ideais para ocorrência e disseminação do patógeno são temperaturas amenas e alta umidade do ar. Em extensa revisão sobre dispersão de patógenos, BROWN & HOVMOLLER (2002) demonstram que esta dispersão é de escala intercontinental, tendo relatos de patógenos que dispersaram da América Central e do Sul da África para o Sul da Austrália. Devido a esta grande capacidade de dispersão, tem sido difícil os cultivares manterem-se resistentes por muitos anos, exigindo do melhoramento uma constante obtenção de genótipos com resistência a novas raças.

No Brasil, os prejuízos ocasionados pela ferrugem da folha ocorrem anualmente. Normalmente, entre uma a três novas raças de *P. triticina* são detectadas a cada ano (BARCELLOS et al., 1997). A incidência generalizada nas

diferentes regiões tritícolas varia em intensidade, dependendo das condições climáticas, da resistência genética dos cultivares e do controle químico (BARCELLOS, 1994). A importância econômica depende da intensidade e do início de ocorrência da doença, chegando a níveis limitantes à produtividade. Exemplo da severidade das epidemias de ferrugem da folha ocorreu em 1980 no Kazaquistão, quando as perdas chegaram a 100% (BAKER et al., 1997).

O método de controle mais utilizado para evitar grandes perdas de rendimento ainda é a aplicação de produtos químicos. O controle químico aumenta os custos da produção no que se refere à compra dos produtos, maquinarias e mão-de-obra para aplicação na lavoura, além de envolver riscos para a saúde humana e animal e para o equilíbrio ecológico (MORAES-FERNANDES, 1987). Diante disso, a resistência genética é o método mais eficiente e econômico de controle (BARCELLOS, 1994) e o conhecimento da presença de genes de resistência, já descritos, é um fator importante a ser considerado pelos melhoristas na escolha dos genitores para cruzamentos (ZOLDAN, 1998).

Resistência a doenças

PARLERVLIET (1997) define resistência como a capacidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno. Segundo FLOR (1956), a resistência ou suscetibilidade de uma planta a um fungo causador de ferrugem e a avirulência ou virulência do patógeno em relação à planta, é a expressão da interação do complexo gênico e citoplasmático do patógeno, influenciado pelo ambiente que atua sobre o hospedeiro e patógeno. Segundo

BAKER et al. (1997), em plantas o complexo gênico envolvido com a resistência a doenças é dividido em dois grupos; genes de resistência (R) e genes relacionados com defesa (DR) (do inglês *Defense related genes*). Os genes R são os de maior importância por estarem diretamente relacionados com o reconhecimento específico do patógeno. Durante o processo inicial de infecção, ocorre o reconhecimento do produto do gene de avirulência (*Avr*) do patógeno pelo produto do gene R da planta. Após esta interação, é desencadeada uma cascata de sinais onde estão envolvidas diversas moléculas e substâncias, dentre elas, ácido salicílico e espécies reativas de oxigênio. Estas ativam a expressão dos genes DR, desencadeando o processo de resistência sistêmica adquirida na planta. Em plantas com ausência do gene R, não há o reconhecimento do produto do gene *Avr* do patógeno, o que as torna suscetíveis (BAKER et al., 1997).

Vários genes para resistência à ferrugem da folha foram localizados nos três genomas do trigo. Alguns desses genes estão localizados em cromossomos homeólogos com distâncias similares do centrômero, sugerindo que eles devam representar variantes alélicas de diferentes genomas. Devido ao baixo nível de polimorfismo encontrado dentro dos cultivares de trigo, o uso de isolinhas, contendo genes de resistência à ferrugem provenientes de espécies silvestres, representa, provavelmente, o melhor germoplasma para identificar genes de resistência, por possuírem maior nível de polimorfismo na região do gene de interesse (AUTRIQUE et al., 1995).

Em trigo, os genes de resistência à ferrugem da folha são denominados *Lr* (do inglês Leaf rust). Atualmente, existem 51 genes *Lr* identificados (Tabela 1), além dos que possuem designação temporária (Tabela 2). Novas fontes de

resistência são divulgadas e utilizadas pelos melhoristas, embora as ferrugens continuem a evoluir e a desafiar os especialistas, pela dificuldade de obter resistência durável.

Quanto maior for o número de genes de resistência em um cultivar, maior será o número de mutações requeridas para que o patógeno supere a resistência. Portanto, o conhecimento, tanto do número como de novos genes para resistência em um novo cultivar é de extrema valia para os programas de melhoramento genético, pois permite que seja mantida uma proteção consistente contra o fungo.

Tabela 1 - Genes de resistência à ferrugem da folha do trigo, sua localização no genoma e sua fonte (modificada de BRAMMER, 2000)

Genes <i>Lr</i>	Localização no genoma	Fonte	Genes <i>Lr</i>	Localização no genoma	Fonte
1	5DL	Malakof	25	4BL	Rosen rye
2a	2DS	Webster	26	1BL	Imperial rye
2b	2DS	Carina	27	3BS	Gatcher
2c	2DS	Brevit	28	4AL	<i>T. speltoides</i>
3a	6BL	Democrat	29	7DS	<i>A. elongatum</i>
3bg	6BL	Bage	30	4BL	Terenzio
3ka	6BL	Klein Aniversario	31	4BS	Gatcher
9	6BL	<i>T. umbellulatum</i>	32	3D	<i>T. tauschii</i>
10	1AS	Lee	33	1BL	PI58458
11	2A	Hussar	34	7D	Terenzio
12	4BS	Exchange	35	2B	<i>T. speltoides</i>
13	2BS	Frontana	36	6BS	<i>T. speltoides</i>
14a	7BL	Hope	37	2AS	<i>T. ventricosa</i>
14b	7BL	Bowie	38	2AL	<i>A. intermedium</i>
15	2DS	Kenya 1-12 E-19-J	39	2DS	<i>T. tauschii</i>
16	2BS	Exchange	40	1D	<i>T. tauschii</i>
17	2AS	Klein Lucero	41	1D	<i>T. tauschii</i>
18	5BL	<i>T. timopheevi</i>	42	1D	
19	7DL	<i>Agropyron elongatum</i>	43	7D	<i>T. tauschii</i>
20	7AL	Thew	44	1BL	<i>T. aestivum</i> spelta 7831
21	1DL	<i>T. tauschii</i>	45	2AS	<i>S. cereale</i>
22a	2DS	Thatcher	46	1BL	Pavon 76
22b	2DS	<i>T. tauschii</i>	47	7AS	<i>T. speltoides</i>
23	2BS	Gabo	48		CSP 44
24	3DL	<i>A. elongatum</i>	49		VL 404

Tabela 2 - Genes de resistência à ferrugem da folha do trigo com nomenclatura temporária, sua localização no genoma e sua fonte (modificada de BRAMMER, 2000)

Genes	Localização no genoma	Fonte
<i>Lr19d</i>		<i>Thinopyrum distichum</i>
<i>B</i>		Brevit
<i>Exch</i>		Exchange
<i>HelV</i>		Regina
<i>I</i>		CSP 44
<i>J</i>		CSP 44
<i>K</i>		Oxley
<i>L</i>		CPAN 1235
<i>LC</i>		Little Club
<i>LrA</i>	2Ds	<i>T. tauschii</i>
<i>LrAPR</i>		KS91WGRC12 (Century/ <i>T. tauschii</i> TA2451)
<i>LrB</i>	5D	<i>T. tauschii</i>
<i>LrC</i>		<i>T. tauschii</i>
<i>LrD</i>		<i>T. tauschii</i>
<i>Lrv</i>		G-516 [Favorit/(<i>Aegilops variabilis</i>) <i>T. pergrinum</i>]
<i>M</i>		CPan1235
<i>M marks</i>		Trorysa
<i>Mo</i>		Morocco
<i>N</i>		VL 404
<i>O</i>		VL 404
<i>T3</i>		Terenizo
<i>Tm</i>	6A	<i>T. monococcum</i>
<i>Tr</i>		<i>T. triunciale</i>
<i>Trp-1</i>	1AS*	Toropi
<i>Trp-2</i>	4DS*	Toropi

* mapeados por nosso grupo

Em trigo, há resistência em fase de plântula e de planta adulta (BARCELLOS et al., 1997). A que apresenta maior importância é a resistência de planta adulta, pois é nesta fase que ocorre maior desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, maiores prejuízos para a planta. A resistência ainda pode ser completa ou parcial. A resistência completa é conferida por genes de efeito maior no fenótipo, geralmente se manifesta em fase de plântula e é específica à raça. Esta geralmente mantém-se por um período muito curto, isto devido à alta pressão de seleção que exerce sobre o patógeno, o que leva a rápida quebra da resistência. Exemplo disso ocorreu com o cultivar de trigo Alondra, portador do gene *Lr26*, o qual teve sua resistência superada mesmo antes de seu cultivo em escala comercial. Outros exemplos ocorreram com os cultivares Tifton e CEP14, que se tornaram suscetíveis um ano após o lançamento (BARCELLOS et al., 1997). Já a resistência parcial é geralmente conferida por mais de um gene, não específica à raça e se expressa em fase adulta. Esse tipo de resistência não elimina o patógeno completamente e sim interfere na sua taxa de desenvolvimento e reprodução. Assim, a resistência parcial permite a sobrevivência do patógeno, mantendo-o em um nível baixo, o qual não chega a causar dano significativo à planta. A grande vantagem deste tipo de resistência está no fato dela exercer uma pressão de seleção menos intensa sobre o patógeno e, conseqüentemente, ser capaz de conferir maior durabilidade (JOHNSON, 1984).

Segundo JOHNSON (1984), a resistência é considerada durável quando permanece efetiva em uma variedade extensivamente cultivada por vários anos e em um ambiente que favoreça a doença. No trigo, a resistência parcial é a que

tem se mostrado mais durável, sendo assim a mais recomendada para o uso em programas de melhoramento, apesar da difícil manipulação.

Melhoramento para resistência à ferrugem da folha

Em função da natureza dinâmica da relação cereal-fungo, a produção agrícola exige uma contínua reposição e diversificação dos genes de resistência, para prevenir epidemias e evitar perdas que possam ser totais, por isso a demanda de pesquisa é permanente (MCINTOSH et al., 1995; ZOLDAN 1998).

Tradicionalmente os programas de melhoramento genético de cereais de inverno têm introduzido resistência qualitativa para superar a adaptação dos patógenos ao hospedeiro, principalmente pelo fato de serem de herança simples e de fácil manipulação. No entanto, a obtenção de resistência com maior estabilidade, associada à resistência parcial não específica à raça, quantitativa ou de planta adulta é, atualmente, a estratégia mais indicada para o controle da ferrugem da folha do trigo. Apesar da disponibilidade de muitos genes *Lr* úteis ao melhoramento no germoplasma brasileiro de trigo, sua utilização apenas através de métodos convencionais tem sido limitada.

A herança da resistência parcial não específica à raça foi investigada com certo detalhe em um número limitado de sistemas hospedeiro/patógeno, sendo freqüentemente recessiva. A tendência em trigo é de poucos genes, em muitos casos dois a três conferindo resistência à *P. triticina* (BARTOS et al., 1969, DYCK & SAMBORSKI, 1982; LEE & SHANER, 1985; BARCELLOS, 1994; BARCELLOS et al., 2000).

O cultivar brasileiro de trigo Frontana tem sido o mais usado mundialmente como fonte de resistência não específica à raça. Além de possuir os genes *Lr13*, *Lr34* e *T3*, já identificados como responsáveis, em conjunto, pela maior parte dessa resistência, outros genes de menor efeito parecem estar envolvidos (ROELFS et al., 1992). No Brasil, a resistência deste cultivar ofereceu proteção adequada enquanto os cultivares em uso eram descendentes diretos de Frontana, pois havia baixa incidência e, conseqüentemente, a ferrugem da folha era considerada de importância secundária. Quando Frontana e outros cultivares portadores do mesmo tipo de resistência foram substituídos por trigos suscetíveis, principalmente pela introdução de germoplasma do CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo*), ficou evidenciada a importância econômica do patógeno e a resistência a esta enfermidade passou a receber atenção especial nos programas de melhoramento do país (SILVA, 1974).

Atualmente a melhor perspectiva do melhoramento para controle da ferrugem da folha consiste em empregar combinações de genes, independentemente de serem genes de efeitos maiores ou menores no fenótipo. ROELFS et al. (1992) sugeriu que *Lr12* e *Lr13*, ambos genes de planta adulta, poderiam, em combinações com *Lr34*, ser a base para a maioria da resistência durável observada em grande parte dos genótipos disponíveis. A combinação conferida pelos genes *Lr13* e *Lr34* tem sido muito eficaz. Contudo, sob condições muito favoráveis à doença, é às vezes ineficiente (ROELFS et al., 1992).

Seleção assistida por marcadores moleculares

Um marcador molecular é descrito como “todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou um segmento de DNA” (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1995). MILACH (1998) define: “marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente”.

Os marcadores moleculares têm vantagens sobre os marcadores convencionais, porque, na grande maioria, são herdados codominantemente e raramente exibem interações epistáticas ou pleitrópicas; podem ser detectados tanto em tecidos jovens como adultos e, teoricamente utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. A utilização de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento.

A seleção assistida por marcadores consiste na identificação precoce de plantas que apresentam fenótipo desejável pela análise molecular de seu genótipo. MOHAN et al. (1997) destacam três requisitos básicos para a realização de seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento: 1) o marcador deve estar associado ao gene de interesse; 2) a técnica deve ser eficiente para a avaliação de grandes populações e baseada em PCR; 3) a técnica deve mostrar-se altamente reproduzível entre laboratórios, ser econômica e de fácil condução. Dentre os marcadores utilizados, somente os marcadores PCR-específicos apresentam todas as características desejadas para a implantação na rotina em programas de melhoramento.

Para muitos genes *Lr* há marcadores PCR-específicos STS (*Sequence Target Site*) ou SCAR (*Sequence Characterised Amplified Region*) desenvolvidos (revisão em DA-SILVA 2001), no entanto esses marcadores foram desenvolvidos em cultivares que não são utilizados em programas de melhoramento de trigo no Brasil. Para possibilitar o uso desses marcadores na seleção assistida nos programas de melhoramento de trigo no país, há a necessidade de validação dos mesmos para cultivares aqui utilizados.

Muitos genes que são importantes para o melhoramento para resistência à ferrugem da folha no Brasil não possuem marcadores PCR-específicos associados. Dentre estes estão os genes de resistência específica à raça *Lr23* e *Lr26* e os genes *Lr13* e *Lr34*, que conferem resistência não específica à raça. Desta maneira a identificação de marcadores moleculares associados a estes genes poderá facilitar a piramidização destes genes.

A disponibilização de marcadores moleculares PCR-específicos, que são de fácil manipulação e econômicos, auxiliará os melhoristas de trigo no desenvolvimento de variedades resistentes mais apropriadas às condições agroecológicas brasileiras, proporcionando maior produção e, conseqüentemente, aumento de divisas e elevação das condições sócio-econômicas do país.

Abordagens de estudo do genoma do trigo

O genoma do trigo é aproximadamente 35 vezes maior que o genoma do arroz, sendo um dos maiores entre as plantas cultivadas (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991). Aproximadamente 95 a 99% deste genoma é composto por seqüências não transcritas consistindo principalmente de retrotransposons e DNA

repetitivo (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991, SANMIGUEL et al., 1996; WENDEL, 2000; SANDHU & GILL, 2002). O restante 1 a 5% é a parte do genoma denominada regiões ricas em genes, organizadas em ilhas gênicas variando em tamanho e em quantidade de genes (ERAYMAN et al., 2003). Devido a esta complexa organização genômica, a clonagem de genes por técnicas convencionais tem sido limitada em trigo. Entre as técnicas mais utilizadas para clonagem de genes em plantas cultivadas estão a inserção de transposons e clonagem posicional ou baseada em mapeamento molecular. A inserção de transposons depende da inativação do gene de interesse pela inserção do transposon na região codificante do gene. Esta técnica não tem sido aprimorada para clonagem em trigo e, quando utilizada para clonagem de genes de resistência a doenças em plantas, a inserção do transposon na região de interesse tem se mostrado muito baixa (BRUTNELL 2002). A clonagem baseada em mapeamento molecular exige um mapa extremamente saturado na região do gene que pretende-se clonar. Em trigo, devido à natureza de seu genoma, a saturação de regiões de interesse a ponto de permitir a clonagem por mapa tem se mostrado muito difícil (STEIN et al., 2000).

Devido a esta complexa organização genômica, a melhor estratégia para a marcação e isolamento de genes em trigo seria o uso de técnicas que trabalham somente com a parte expressa do genoma ou técnicas que possibilitam trabalhar diretamente nas regiões ricas em genes.

Até o momento, mais de 50 genes que conferem resistência a doenças (genes R) foram clonados em várias espécies de plantas. Estes genes são classificados em cinco classes, de acordo com a presença de domínios

específicos (BAKER et al., 1997). A primeira e maior destas classes é a que contém os genes que codificam para proteínas denominadas NBS-LRR. Estas proteínas apresentam um domínio central conservado com sítios de ligação a nucleotídeos trifosfatados (domínio NBS) e um domínio C-terminal rico em repetições de leucina (domínio LRR) (WENKAI et al., 2006). O domínio LRR parece estar envolvido na especificidade de reconhecimento de moléculas do patógeno produzidas durante o processo de infecção (BELKHADIR et al., 2004). O domínio NBS promove hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e ativa uma sinalização celular que pode estar envolvida na resposta de resistência da planta (BELKHADIR et al., 2004). A classe NBS-LRR é dividida em duas sub-classes de acordo com a presença de domínios específicos na região N terminal da proteína. A primeira sub-classe, possui uma região *toll-interleukin receptor-like* e é denominada sub-classe TIR, que é encontrada somente em dicotiledôneas. A segunda sub-classe que possui um domínio *coiled coil*, é denominada sub-classe CC e é encontrada tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (MEYERS et al., 1999; MONDRAGON-PALOMINO et al., 2002). A segunda classe dos genes R possui somente um domínio LRR. A terceira classe apresenta um domínio LRR e um PK (proteína quinase). A quarta classe apresenta somente um domínio PK (BAKER et al., 1997) e a quinta classe um domínio LRR, um NBS e um motivo TIR. Estes domínios, presentes nos genes R, possuem um ou mais motivos com seqüências de aminoácidos altamente conservados. O domínio LRR possui de 9 a 41 repetições imperfeitas de leucina com aproximadamente 25 aminoácidos cada e seqüência consenso xx(L)x(L)xxxx (COOLEY et al., 2000). O domínio PK apresenta um motivo com no máximo 25 aminoácidos no qual os três

primeiros são DFG e os dois últimos PE, sendo que entre estes ocorre invariavelmente a presença de treonina (T) e serina (S), estes fundamentais para a autofosforilação da proteína (LIU et al., 2002). O domínio NBS não é exclusivo de genes R, este está presente em outras proteínas quinases tais como proteínas de ligação de ATP/GTP. Este domínio apresenta seis motivos: quinase-1a (p-loop), quinase-2, quinase-3a, GLPL, RNBS-D e MHD (HOMMOND-KOSACK & JONES, 1997, MEYERS et al., 1999). Dentre estes, os motivos quinase-1a (p-loop), quinase-2 e quinase-3a são os que possuem maior nível de conservação, apresentando as seguintes seqüências consenso: p-loop GxxxGxGK(T/S)T, quinase-2 LxxxDDVW e quinase-3a GxxxxTxR. Apesar destes motivos serem comuns a outras proteínas, as seqüências no qual ocorrem e as disposições dos aminoácidos conservados são únicas nos genes R (HOMMOND-KOSACK & JONES, 1997, MEYERS et al., 1999). Em trigo, todos os genes clonados ou caracterizados (*Cre3*, *Yr10*, *Lr10*, *Lr21*, *Pm3b*) apresentam o domínio NBS com estes motivos conservados (LAGUDAH et al., 1997; SPIELMEYER et al., 2000; FEUILLET et al., 2003; HUANG et al., 2003; YAHIAOUI et al., 2004).

A análise das seqüências do genoma de *Arabidopsis* revelou a presença de 166 prováveis genes NBS-LRR e em arroz foram identificados aproximadamente 600 (TAGI, 200; RICHLIY et al., 2002; GOFF et al., 2002). Em plantas onde não há a seqüência completa do genoma é difícil estimar a quantidade destas seqüências no genoma. Devido à observação de que a maioria dos genes R clonados apresenta o domínio NBS (37 dos 50 clonados até o momento), o desenho de primers degenerados baseados em motivos conservados deste domínio tem sido amplamente utilizado para amplificação em

massa de RGAs (*Resistance Gene Analogues* – Análogos a Genes de Resistência) em diversas espécies (KANAZIN et al., 1996; LEISTER et al., 1996; YU et al., 1996; SPIELMEYER et al., 1998; MAGO et al., 1999; COLLINS et al., 2001; CORDEIRO & SKINNER, 2002; HUETTEL et al., 2002; CORTESE et al., 2003, WENKAI et al., 2006). Até o momento aproximadamente 800 RGAs foram identificados em 20 espécies de plantas (WENKAI et al., 2006). Em trigo, DILBIRLIGI et al. (2003), identificaram 220 RGAs utilizando *data mining* e uma metodologia de *fingerprinting* de RNA modificada com uma combinação de primers poli-T e primers degenerados obtidos a partir de motivos da região NBS. O mapeamento de 164 destes RGAs revelou que estes encontram-se agrupados em 26 regiões diferentes do genoma, regiões estas onde também estão mapeados 90 dos 110 genes de resistência fenotipicamente caracterizados em trigo (DILBIRLIGI et al., 2004).

A potencial função dos RGAs tem sido avaliada por análises genéticas. Como resultado, vários RGAs tem se mostrado associados a locos que conferem resistência a doenças em várias espécies (KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996; SPIELMEYER et al., 1998; COLLINS et al., 2001; CORDEIRO & SKINNER, 2002; HUETTEL et al. 2002; CORTESE et al. 2003; RAMALINGAM et al., 2003; WENKAI et al., 2006), e muitos desses co-segregam com genes de resistência, o que indica que podem representar parte funcional desses genes (LEISTER et al., 1996; SHEN et al., 1998; GARCIA-MAS et al., 2001; BROTMAN et al., 2002; HUETTEL et al., 2002, SHEN et al., 2002). Em trigo o primeiro gene de resistência à ferrugem folha (*Lr21*) foi clonado a partir de um marcador RGA, que em estudos de segregação mostrava-se associado ao gene (HUANG & GILL

2001). Após clonado, comprovou-se que este RGA era parte funcional do gene (HUANG et al., 2003). O mesmo ocorreu com um RGA identificado em alface, que foi comprovado ser parte funcional do gene *DM3* (SHEN et al., 2002). Esses resultados demonstram a potencialidade da exploração destes domínios conservados para isolar RGAs associados à resistência a doenças e para desenvolver marcadores moleculares para a seleção assistida.

Embora o uso de *primers* degenerados seja uma técnica eficiente para isolamento de RGAs associados à resistência a doenças, esta parece ser limitada à resistência específica à raça, uma vez que os genes que conferem resistência não específica à raça parecem não apresentarem motivos NBS. ALVAREZ-ZAMORANO (1995), estudando o mecanismo de resistência conferido pelo gene *Lr34*, (que confere resistência não específica à ferrugem da folha em trigo) por microscopia eletrônica, observou que este gene possui um mecanismo de resistência diferente do mecanismo de resposta por hipersensibilidade característico da resistência específica à raça. Quando infectou com fungos plantas que continham o gene *Lr34*, estas apresentaram acumulação de uma substância eletrodensa desconhecida nas células da planta, próximo ao local onde as células mãe do haustório são estabelecidas. Parece que este acúmulo causa um engrossamento de parede de célula, levando a uma redução do estabelecimento do haustório do fungo. Se os haustórios são formados, o crescimento do micélio é lento, podendo ser devido a uma restrição “do movimento” do fungo de uma célula para outra pela substância eletrodensa formada (ALVAREZ-ZAMORANO, 1995). Este mecanismo de resistência é semelhante ao conferido pelo gene *mlo* em cevada, que também promove

resistência durável, neste caso contra o míldio. O gene *mlo* e todos os genes de resistência não específica à raça apresentam uma estrutura totalmente diferente dos genes de resistência clonados até o momento (não apresenta domínios NBS-LRR). LI et al. (1999), usando sondas derivadas de genes de resistência, mapeou 167 locos em todas as regiões cromossômicas de trigo que contêm genes de resistência previamente identificados, com exceção da região onde se encontra o gene *Lr34* e do cromossomo 4D. Estes autores sugerem que o gene *Lr34* seja diferente dos genes de resistência NBS-LRR. DILBIRLIG et al. (2004) mapearam 220 RGAs em todos os cromossomos do trigo com exceção, também, da região onde se encontra o gene *Lr34* e da região do cromossomo onde foi mapeado gene *trp-2* que, assim como o gene *Lr34*, em combinação com outro gene (*trp-1*) confere resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo (BARCELLOS et al., 2000; DA-SILVA, 2002). Estes dados reforçam a hipótese que os genes que conferem resistência durável apresentam estrutura gênica diferente dos genes NBS-LRR, o que inviabiliza o uso de primers degenerados para identificar marcadores moleculares associados a estes genes.

Em trigo, foi desenvolvida uma série de linhagens diferenciais do cultivar Thatcher contrastantes para vários genes de resistência à ferrugem da folha, dentre eles *Lr13* e *Lr34*. Desta maneira, a diferença entre estas linhagens é mínima, podendo estar quase que exclusivamente na região onde se encontra o gene transferido. Quando se trabalha com a técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (VOS et al. 1995) na busca de marcadores moleculares associados a uma característica de interesse, identifica-se um grande número de bandas distribuídas aleatoriamente no genoma em estudo. A possibilidade de

combinar o uso de linhagens diferenciais, que apresentam diferenças mínimas no genoma, com a técnica de AFLP poderá permitir a identificação de seqüências associadas aos genes que conferem resistência não específica à raça sem a necessidade de análise de todo o genoma de maneira rápida e mais precisa.

Mecanismos moleculares da interação planta-patógeno

A percepção da presença do patógeno pela planta desempenha um papel fundamental no processo de resistência (MONTESANO et al., 2003). Para os genes que conferem resistência por hipersensibilidade específica à raça a teoria mais difundida, e com exemplos já comprovados, é que há uma interação direta entre o produto do gene de avirulência (Avr) do patógeno e o produto do gene de resistência da planta (R), culminando na expressão da resistência (BELKHADIR et al., 2004). Na resistência não específica à raça não se sabe como ocorrem estes eventos primários de sinalização. Provavelmente há também a interação de elicitores do patógeno com receptores nas plantas, no entanto elicitores diferentes dos genes Avr podendo ser proteínas secretadas e fragmentos da parede celular do fungo ou produtos da própria planta originados pela degradação provocada pelo fungo. Estes elicitores são classificados como gerais (KAKU et al., 2006). As plantas capazes de reconhecer estes tipos de elicitores parecem ter uma resistência mais ampla, pois estes não são específicos a uma única raça (MONTESANO et al., 2003).

Os mecanismos de resposta desencadeados nas plantas pelo reconhecimento do patógeno através dos genes de resistência têm sido intensamente estudados (VERONESE et al., 2003). As interações incompatíveis

(resistência) resultam na produção pela planta de uma série de sinalizadores secundários que incluem espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Estas moléculas sinalizadoras ativam os mecanismos de defesa das plantas que acabam por eliminar o patógeno. Estes mecanismos incluem reposta por hipersensibilidade, reforço da parede celular e a síntese de substâncias antimicrobianas como proteínas relacionadas a patogênese (PRPs) e fitoalexinas (VERONESE et al., 2003). Em dicotiledôneas, logo após o reconhecimento do patógeno pelos genes de resistência ocorre aumento das concentrações citosólicas de ácido salicílico (AS) e explosão oxidativa. O aumento das concentrações de AS no citosol promove a dissociação da proteína *NPR1* a monômeros que migram para o núcleo da célula, levando à indução da resistência sistêmica adquirida (RSA) (DESPRÉS et al., 2003). Em monocotiledôneas mesmo não ocorrendo alterações nas concentrações de AS, ocorre a ativação da RSA via *NPR1* (KOGEL & LANGEN, 2005). Estudos realizados em cevada comparando a resistência específica à raça e não específica à raça demonstraram que na resistência não específica à raça, além de não haver mudanças nas concentrações de AS, também parece não haver estresse oxidativo a nível tão elevado, pois as enzimas características de resposta ao estresse oxidativo não apresentaram diferenças no padrão de expressão em plantas com genes de resistência não específica à raça (HEIN et al., 2004). Desta forma acreditamos que em monocotiledôneas, na resistência não específica à raça, a sinalização para desencadear os mecanismos de resistência não depende de alto estresse oxidativo e nem de mudança nas concentrações de AS como ocorre na resistência por hipersensibilidade e em dicotiledôneas.

Provavelmente sinalizadores secundários, capazes de perceber sensíveis mudanças no potencial redox da célula, ou mesmo capazes de perceber outros tipos de mudança ocorrida pela presença do patógeno, devem desempenhar este papel neste tipo de resistência.

Aparentemente, a diferença entre a planta resistente e suscetível está relacionada à rapidez com que esta responde a ataque de patógenos. Em plantas resistentes, a expressão de genes de defesa é mais rápida e mais intensa do que em plantas suscetíveis (MALECK et al., 2000; MARTINEZ DE ILARDUYA et al., 2003, LI et al., 2006). Muitos genes que são ativados em resposta a estresse biótico também são ativados em resposta a estresse abiótico (GLOMBITZA et al., 2004). Isto sugere que provavelmente a especificidade da resposta está nos primeiros genes ativados durante a interação planta-patógeno.

Os mecanismos moleculares da interação planta-patógeno têm sido extensivamente estudados em *Arabidopsis*, tomate e arroz (MALECK et al., 2000; BITTNER-EDDY et al., 2003; MARTINEZ DE ILARDUYA et al., 2003; LI et al., 2006; XIONG et al., 2001; MATSUMURA et al., 2003; JANTASURIYARAT et al., 2005). Em trigo, KRUGER et al. (2002) analisaram uma biblioteca de EST (*Expressed Sequence Tag*) oriunda de espigas de trigo infectadas com fusarium. Estes autores identificaram 2831 seqüências, dentre estas diversas seqüências com homologia a genes previamente relacionados aos mecanismos de resistência a doenças em outras espécies. No entanto, estes autores não puderam afirmar que estes genes são responsáveis pelos mecanismos de resistência em trigo, pois não utilizaram nenhuma técnica capaz de separar genes de expressão constitutiva da planta e genes induzidos pelo patógeno. LU et al. (2005),

analisando os mecanismos de resistência do trigo ao carvão, por hibridização subtrativa suprimida (SSH, do inglês *Supression Subtractive Hybridization*), identificaram 168 seqüências diretamente envolvidas nos mecanismos de resistência. Dentre as seqüências identificadas encontram-se seqüências com alta homologia a genes de resistência, PRPs, fatores de transcrição, proteínas de transferência de lipídios não-específicas, lípases, etc.

Com exceção destes dois trabalhos em trigo, estes estudos tem sido realizados em plantas diplóides e com resistência específica à raça do tipo monogênica. Pouco se sabe dos mecanismos envolvidos na resistência a doenças em plantas poliplóides, e também na resistência poligênica não específica à raça. Em relação à ferrugem da folha do trigo nenhum trabalho foi publicado relatando os mecanismos envolvidos na resistência.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-ZAMORANO R. **Patogenesis de *Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. f. sp. *tritici* y la resistencia en trigo**. 1995. 76p Montecillos, México, Colégio Postgraduados, Ph.D. Thesis, 1995.
- ANGRA, D.C. **Transferência da resistência à ferrugem da folha através de cruzamentos intergenéricos entre *Triticum aestivum* e *Agropyrum elongatum***. 1995. 85p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, 1995.
- ANIKSTER, Y.; BUSHNELL, W. R.; EILAM, T.; MANISTERSKI, J.; & ROELFS, A.P. *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. **Can. J. Bot.** 75: 2082-2096, 1997.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E. D. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. **Plant Mol. Biol. Rep.**9:211-215, 1991.
- AUTRIQUE, E.; SINGH, R.P.; TANKSLEY, S.D. & SORRELLS M. E. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. **Genome**, 38:75-83, 1995.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; & DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, 276:726-733, 1997.

- BARCELLOS, A.L. **Genética de resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. Porto Alegre: UFRGS, 1994. 163p. Tese Doutorado.
- BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. & ROELFS, A.P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. **Summa Phytopathologica**, 23: 101-111, 1997.
- BARCELLOS, A. L.; ROELFS, A. P. & MORAES-FERNANDES, M. I. B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi. **Plant Disease**, 84: 90-93, 2000.
- BARTOS, P.; DYCK, P. L. & SAMBORSKI, D. J. Adult-plant leaf rust resistance in Thatcher and Marquis wheat: a genetic analysis of the host parasite interaction. **Can. J. Bot.** 47:267-276, 1969.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R. & DANGL, J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Curr Opin Plant Biol** 7: 391–399, 2004.
- BELL, G. D. H. **The history of Wheat cultivation**. In: LUPTON, F. G. H. **Wheat Breeding**. London, New York, Chapman and Hall: 31-50, 1987.
- BITTNER-EDDY, P.; ALLEN, R. L.; REHMANY, A. P.; BIRCH, P. & BEYNON, J. L. Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant Pathol.** 4: 501-507, 2003.
- BRAMMER, S. P. **Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 2000. 105p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- BROTMAN, Y.; SILBERSTEIN, L.; KOVALSKI, I.; PERIN, C.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; KLINGLER, J.; THOMPSON, G. A. & PERL-TREVES, R. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance **Theor. Appl. Genet.** 104: 1055-1063, 2002.
- BROWN, J. K. M. & HOVMØLLER, M. S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, 297: 537-541, 2002.
- BRUTNELL, T. P., Transposon tagging in maize. **Funct. Integr. Genomics**, 2: 4–12, 2002.
- COLLINS, N. C.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J. & PRYOR, A. J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome**, 44: 375–381, 2001.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 27 de jun. 2006.
- COOLEY, M. B.; PATHIRANA, S.; WU, H. J.; KACHROO, P. & KLESSIG, D. F. Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. **Plant Cell** 12: 663–676, 2000.
- CORDERO, J. C. & SKINNER, D.Z. Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1283-1289, 2002.

- CORTESE, M. R.; FANELLI, E. & DE GIORGI, C. Characterization of nematode resistance gene analogs in tetraploid wheat. **Plant Science**, 164: 71-75, 2003.
- DA-SILVA, P. R. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 2002, 64 p. Dissertação da Mestrado. Programa de Pós-Graduação e Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.
- DESPRES, C.; CHUBAK, C.; ROCHON, A.; CLARK, R.; BETHUNE, T. DESVEAUX, D. & FOBERT, P. R. The Arabidopsis *NPR1* disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. **Plant Cell**, 15: 22181–2191, 2003.
- DILBIRLIGI, M.; ERAYMAN, M.; SANDHU, D.; SIDHU, D. & GILL, K. S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. **Genetics**, 166: 461–481, 2004.
- DYCK, P. L. & SAMBORSKI, D. J. The inheritance of resistance to *Puccinia recondita* in a group of common wheat cultivars. **Can. J. Genet. Cytol.** 24: 273-283, 1982.
- ERAYMAN, M.; SANDHU, D.; SIDHU, D.; DILBIRLIGI, M.; BAENZIGER, S. & GILL, K. S. Demarcating the gene-rich regions of the wheat genome. **Nucl. Acids Res.** 32: 3546-3565, 2004.
- FAO - **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 27 de jun. 2006.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p. (EMBRAP-CENARGEM. Documentos, 20).
- FEUILLET, C.; TRAVELLA, S.; STEIN, N.; ALBAR, L.; NUBLAT, A. & KELLER, B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 15253-15258, 2003.
- FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Adv. Genet.** 8: 29-54, 1956.
- GARCIA-MAS, J.; VAN LEEUWEN, H.; MONFORT, A.; DE VICENTE, M.C.; PUIGDOMENECH, P. Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon **Plant Science**, 161: 165-172, 2001.
- GLOMBITZA, S.; DUBUIS, P. H.; THULKE, O.; WELZL, G.; BOVET, L.; GÖTZ, M.; AFFENZELLER, M.; GEIST, B.; HEHN, A.; ASNAGHI, C.; ERNST, D.; SEIDLITZ, H. K.; MARTINOIA, E.; WERCK-REICHHART, D. D.; MAUCH, F. & SCHÄFFNER, A. R. Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. **Plant. Mol. Biol.** 54: 1-19, 2004.
- GOFF, SA.; RICKE, D.; LAN, TH.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H.; HADLEY, D.; HUTCHISON, D.; MARTIN, C.; KATAGIRI, F.; LANGE, BM.; MOUGHAMER, T.; XIA, Y.; BUDWORTH, P.; ZHONG, J.; MIGUEL, T.; PASZKOWSKI, U.; ZHANG, S.; COLBERT, M.; SUN, WL.; CHEN, L.; COOPER, B.; PARK, S.; WOOD, TC.; MAO, L.; QUAIL, P.; WING, R.; DEAN, R.; YU, Y.; ZHARKIKH, A.; SHEN, R.; SAHASRABUDHE, S.; THOMAS, A.; CANNINGS, R.; GUTIN,

- A.; PRUSS, D.; REID, J.; TAVTIGIAN, S.; MITCHELL, J.; ELDREDGE, G.; SCHOLL, T.; MILLER, RM.; BHATNAGAR, S.; ADEY, N.; RUBANO, T.; TUSNEEM, N.; ROBINSON, R.; FELDHAUS, J.; MACALMA, T.; OLIPHANT, A, & BRIGGS, S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science** 296:9 2–100, 2002.
- HAMMOND-KOSACK, K. & JONES, J., Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.** 48: 575-608, 1997.
- KAKU, H.; NISHIZAWA, Y.; ISHII-MINAMI, N.; AKIMOTO-TOMIYAMA, C.; DOHMAE, N.; TAKIO, K.; MINAMI, E. & SHIBUYA, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103: 11086-11091, 2006.
- HEATH, M. C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Ann. Bot.** 80: 713-720, 1997.
- HEIN, I.; CAMPBELL, E. I.; WOODHEAD, M.; HEDLEY, P. E.; YOUNG, V.; MORRIS, W.L.; RAMSAY, L.; STOCKHAUS, J.; LYON, G. D.; NEWTON, A.C. & BIRCH, P. R. Characterisation of early transcriptional changes involving multiple signalling pathways in the *Mla13* barley interaction with powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). **Planta** 218: 803-813, 2004.
- HUANG, L.; BROOKS, S. A.; LI, W. L.; FELLERS, J. P.; TRICK, H. N.; GILL, B. S. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploidy genome of bread wheat. **Genetics** 164: 655–664, 2003.
- HUANG, L.; & GILL, B. S. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilopus tauschii* and wheat. **Theor. Appl. Genet.** 103:1007-1013, 2001.
- HUETTEL, B.; SANTRA, D.; MUEHLBAUER, F.J.; KAHL, G. Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. **Theor. Appl. Genet.** 105: 479-490, 2002.
- JANTASURIYARAT, C.; GOWDA, M.; HALLER, K.; HATFIELD, J.; LU, G.; STAHLBERG, E.; ZHOU, B.; LI, H.; KIM, H.; YU, Y.; DEAN, R. A.; WING, R. A.; SODERLUND, C. & WANG, G. L. Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. **Plant Physiology** 138: 105 – 115, 2005.
- JOHNSON, R. A. Critical analysis of durable resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 22: 309-330, 1984.
- KANAZIN, V.; MAREK L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 11746-11750, 1996.
- KOGEL, K. H. & LANGEN, G. Induced disease resistance and gene expression in cereals. **Cell. Microbiol.** 7: 1555–1564, 2005.
- KRUGER, W. M.; PRITSCH, C.; CHAO, S. & MUEHLBAUER, G. J. Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 15: 445-455, 2002.
- LAGUDAH, E. S.; MOULLET, O. & APPELS R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. **Genome** 40: 659-665, 1997.

- LEE, T. S. & SHANER G. Oligogenic inheritance of length of latent period in six slow leaf-rusting wheat cultivars. **Phytopathology**, 75: 636-643, 1985.
- LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A. PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nat. Genet.** 14: 421-429, 1996.
- LI, C.; BAI, Y.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.; LINDHOUT, P. & BONNEMA, G. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. **Plant. Mol. Biol.** 62:127-140, 2006.
- LI, W. L.; FARIS, J. D.; CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; HULBERT, S. H.; LIU, D. J.; CHEN, P. D. & GILL, B. S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 98:226–233, 1999.
- LIU, G. Z., L. Y. PI, J. C. WALKER: C. RONALD, and W. Y. SONG, Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA21. **J. Biol. Chem.** 277: 20264-20269, 2002.
- LU, Z. X. ; GAUDET, D. A. ; FRICK, M. ; PUCHALSKI, B. ; GENSWEIN, B., & LAROCHE, A. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. **J. Biochem. Mol. Biol.** 38: 420-431, 2005.
- MAGO, R.; NAIR, S.; MOHAN, M. Resistance gene analogs from rice: cloning, sequencing and mapping. **Theor. Appl. Genet.** 99: 50–57 1999.
- MALECK, K.; LEVINE A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K. A.; DANGL, J. L. & DIETRICH, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nat. Genet.** 26: 403-410, 2000.
- MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 27 de jun. 2006.
- MARTINEZ DE ILARDUYA, O.; XIE, Q. & KALOSHIAN, I. Aphid induced defense responses in Mi-1 mediated compatible and incompatible tomato interactions. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 16: 699-708, 2003.
- MATSUMURA, H.; REICH, S.; ITO, A.; SAITOH, H.; KAMOUN, S.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D. H. & TERAUCHI, R. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 15718–15723, 2003.
- MCINTOSH, R. A.; WELLINGS, C. R.; PARK, R. F. **Wheat Rusts: An atlas of resistance genes**, CSIRO Publications, East Melbourne, 1995.
- MEYERS, B. C.; DICKERMAN, A. W.; MICHELMORE, R. W.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; SOBRAL, B. W.; & YOUNG, N. D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Plant J.** 20: 317–332, 1999.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 140p.
- MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R. & SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Mol. Breed.** 3:87-103, 1997.
- MONDRAGON-PALOMINO, M.; MEYERS, B. C.; MICHELMORE, R. W.; & GAUT, B. S. Patterns of positive selection in the complete NBSLRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Genome Res.** 12: 1305–1315, 2002.

- MONTESANO, M.; BRADER, G. & PALVA, E. T. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathol.* 4: 73-79, 2003.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. *Pesq. Agropec. Bras.* 22:881-896, 1987.
- PARLERVLIET, J. E. **Present concepts in breeding for disease resistance private.** In: Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. p. 7-15, 1997.
- RAMALINGAM, J.; CRUZ, C. M. V.; KUKREJA, K.; CHITTOOR, J. M.; WU, J. L.; LEE, S. W.; BARAOIDAN, M.; GEORGE, M. L.; COHEN, M. B.; HULBERT, S. H.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Candidate Defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 14-24, 2003.
- RICHLY, E.; KURTH, J. & LEISTER, D. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol. Biol. Evol.* 19: 76–84, 2002.
- ROELFS, A. P.; SINGH, R. P. & SAARI, E. **Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management.** Mexico: CIMMYT. 81 p, 1992.
- SANDHU, D.; SIDHU, D. & GILL, K. S. Identification of expressed sequence markers for a major gene-rich region of wheat chromosome group 1 using RNA Fingerprinting-Differential Display. *Crop Science*, 42: 1285-1290, 2002.
- SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z. & BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, 274: 765–768, 1996.
- SHEN, K. A.; CHIN, D. B.; ARROYO-GARCIA, R.; OCHOA, O. E.; LAVELLE, D. O.; WROBLEWSKI, T.; MEYERS B.C. & MICHELMORE R. W. *Dm3* is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 251–261, 2002.
- SHEN, K. A.; MEYERS, B. C.; ISLAM-FARIDI, M. N.; CHIN, D. B.; STELLY, D. M. & MICHELMORE, R. W. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 815–823, 1998.
- SILVA, A. R. **Melhoramento para resistência do trigo às doenças e às pragas.** In: **Reunião Latinoamericana do trigo**, Porto Alegre:56-76, 1974.
- SIMONS, M. D. **Crow rust.** In: A. P. Roelfs, W. R. Bushell (Ed.) New York: Academic Press, 132-172, 1985.
- SPIELMEYER, W.; HUANG, L.; BARIANA, H.; LAROCHE, A.; GILL, B. S. & LAGUDAH, E. S. NBS-LRR sequence family is associated with leaf and stripe rust resistance on the end of homoeologous chromosome group 1S of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1139–1144, 2000.
- SPIELMEYER, W.; ROBERTSON, M.; COLLINS, N.; LEISTER, D.; SCHULZE-LEFERT, P.; SEAH, S.; MOULLET, O.; LAGUDAH, E. S. A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*) **GENOME**, 41: 782-788, 1998.
- STEIN, N.; FEUILLET, C.; WICKER, T.; SCHLAGENHAUF, E.; KELLER, B. Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in

- Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97:13436-13441, 2000.
- The Arabidopsis Genome Initiative (TAGI) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, 6814: 796–815, 2000
- VERONESE, P.; RUIZ, M. T.; COCA, M. A.; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; LEE, H.; IBEAS, J. I.; DAMSZ, B.; PARDO, J. M.; HASEGAWA:M.; BRESSAN, R. A.; NARASIMHAN, M. L. Defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant. Physiol.** 131: 1580-1590, 2003
- VOS, HR.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPE, M. & ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414, 1995.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant. Mol. Biol.** 42:225–249, 2000.
- WENKAI, X.; MINGLIANG, X.; JIUREN, Z.; FENGGE, W.; JIANSHENG, L.; JINGRUI, D. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.). **Theor. Appl. Genet.** 113: 63-72, 2006.
- XIONG, L.; LEE, M. W.; QI, M. & YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Mol. Plant Microbe Interact.** 14: 685–692, 2001.
- YAHIAOUI, N.; SRICHUMPA, P.; DUDLER, R. & KELLER, B. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. **Plant Journal**, 37: 528–538, 2004.
- YU, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93:11751-11756, 1996.
- ZOLDAN, S. M. **Identificação de genes de resistência à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 1998, 83p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade de Passo Fundo, 1998.

OBJETIVOS

1 – Avaliar o potencial de cinco marcadores PCR-específicos, associados aos genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* e *Lr24*, para uso na seleção assistida para resistência à ferrugem da folha em programas de melhoramento de trigo no Brasil. (Capítulo II)

2 - Identificar marcadores moleculares AFLP potencialmente associados aos genes de resistência à ferrugem da folha em trigo, *Lr13* e *Lr34*, utilizando linhagens diferenciais contrastantes para estes genes. (Capítulo III)

3 - Identificar e caracterizar análogos a genes de resistência em trigo pela amplificação de regiões conservadas presentes nos genes de resistência utilizando primers degenerados. (Capítulo IV)

4 - Identificar e caracterizar genes envolvidos nos mecanismos moleculares da resistência não específica à raça à ferrugem da folha do trigo. (Capítulo V)

Os resultados serão apresentados em quatro capítulos (II, III, IV e V), escritos na forma de artigos científicos, cada um referente a um objetivo. No capítulo VI será feita uma discussão geral dos resultados obtidos.

CAPÍTULO II

Validação de marcadores PCR-específicos para seleção assistida em programas de melhoramento de trigo no Brasil

Paulo Roberto Da Silva

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul e Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Vinícius Albuquerque Sortica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Patussi Brammer

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-Trigo

Luiz Carlos Federizzi

Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Cristina Kothe Milach

Pioneer Sementes

INTRODUÇÃO

A ferrugem da folha é uma das moléstias que causa maiores prejuízos à triticultura brasileira. A melhor estratégia de controle desta doença é a o uso da resistência genética (BARCELLOS, 1997). Até o momento já foram identificados em trigo aproximadamente 50 genes de resistência à ferrugem da folha (genes *Lr*) (MACINTOSH et al., 2003). Estes genes podem expressar a resistência em fase de plântula ou planta adulta. Os genes que expressam resistência em fase de plântula são geralmente de efeito maior no fenótipo e herdados de forma simples. Os genes que expressam resistência em fase de planta adulta são de efeito menor no fenótipo ou, quando de efeito maior, para haver boa expressão da resistência depende da interação com outros genes de resistência.

Atualmente a melhor perspectiva do melhoramento para controle da ferrugem da folha consiste em empregar combinações de genes, independentemente de serem genes de efeito maior ou menor no fenótipo. A cultivar brasileira de trigo Frontana tem sido a mais usado mundialmente como fonte de resistência. Além de possuir os genes *Lr13*, *Lr34* e *T3*, já identificados como responsáveis, em conjunto, pela maior parte dessa resistência, outros genes de menor efeito parecem estar envolvidos (ROELFS et al., 1992). No Brasil, a resistência deste cultivar ofereceu proteção adequada enquanto os cultivares em uso eram descendentes diretos de Frontana. Quando Frontana e outros cultivares portadores do mesmo tipo de resistência foram substituídos por trigos suscetíveis, principalmente pela introdução de germoplasma do CIMMYT (*Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo*), ficou evidenciada a

importância econômica do patógeno e a resistência a esta enfermidade passou a receber atenção especial nos programas de melhoramento do país (SILVA, 1974).

Segundo ZOLDAN (1998), os genes mais comuns que expressam resistência em fase de plântula em cultivares brasileiros de trigo são *Lr1*, *Lr10*, *Lr14*, *Lr23* e *Lr24*. Já os genes de planta adulta são aqueles derivados de Frontana (*Lr13* e *Lr34*). Quanto maior for o número de genes de resistência em um cultivar, maior será o número de mutações requeridas para que o patógeno supere a resistência. Desta maneira, a piramidização de genes de resistência pode aumentar a vida útil dos cultivares por garantir resistência a um número maior de raças do fungo (NELSON, 1978). No entanto, a piramidização por métodos clássicos de melhoramento tem sido limitada, devido à presença de um gene na planta mascarar o efeito de outro, tornando difícil a avaliação fenotípica da presença individual de cada gene. Assim, o uso de marcadores moleculares associados a genes que conferem resistência à ferrugem da folha em trigo pode aumentar a eficiência da seleção, pois possibilitará ao melhorista selecionar os caracteres de interesse com base no genótipo.

Para muitos genes *Lr* há marcadores PCR-específicos STS (*Sequence Tagget Site*) ou SCAR (*Sequence Characterised Amplified Region*) desenvolvidos (revisão em DA-SILVA 2001). No entanto, esses marcadores foram desenvolvidos em cultivares que não são utilizados em programas de melhoramento de trigo no Brasil. Para possibilitar o uso desses marcadores na seleção assistida nos programas de melhoramento de trigo no país, há a necessidade de validação dos mesmos para cultivares aqui utilizados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial de cinco marcadores PCR-específicos,

associados aos genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* e *Lr24*, para uso na seleção assistida para resistência à ferrugem da folha em programas de melhoramento de trigo no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Para a avaliação do potencial dos marcadores associados aos genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* e *Lr24* no uso para seleção assistida no melhoramento de trigo no Brasil foram utilizados 25 cultivares de trigo com conhecida presença ou ausência destes genes (Tabela 2). A postulação destes genes nestes cultivares foi realizada por ZOLDAN (1998). Para as análises moleculares, as sementes dos cultivares foram germinadas em placas de petri com papel germinador umedecido e mantidas no escuro em câmara de germinação. Após os coleóptilos atingirem aproximadamente seis centímetros, esses foram macerados em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA

O DNA dos cultivares foi extraído de acordo com o protocolo proposto por MURRAY & THOMPSON (1980), com as seguintes modificações: aproximadamente 50 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 600 µl de tampão de extração (CTAB 1% (w/v), 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) pré-aquecido a 65°C. O tecido foi incubado a 65°C no tampão de extração por 60 minutos. O DNA foi separado dessa solução através de uma solução de fenol-clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação. O DNA foi precipitado em etanol a -20°C, ressuspenso em

TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) e tratado com RNase A. Depois de seco, o DNA foi solubilizado em água ultrapura. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™).

Obtenção dos marcadores PCR-específicos e PCR

Para as análises moleculares, foram sintetizados *primers* para os marcadores STS-Lr1, STS-Lr9, STS-Lr24 e SCAR-Lr24 (Tabela 1). Estes *primers* foram utilizados para amplificação por PCR do DNA de 25 cultivares de trigo com conhecida presença ou ausência dos genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* e *Lr24*. Para a PCR foi preparada uma solução contendo 25 ng de DNA, tampão (Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,8 mM de cada), *primer* direto (20 ng), *primer* reverso (20 ng), Taq DNA polymerase (1 U) e água ultrapura até completar um volume de 25 µl. As amplificações foram conduzidas em termociclador de acordo com o protocolo estabelecido na literatura (Tabela 1). Os produtos das amplificações foram resolvidos em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados para amplificar os marcadores pcr-específicos associados aos genes de resistência em estudo.

Marcador	Cromoss	Primers	Fragmento	Referência
STS-Lr1	5DL	R 5'- ccttgccagcccaaaag -3' L 5'- gggtcacgtactactata -3'	560	FEUILLET et al. (1995)
STS-Lr9	6BL	R 5'-ccacactaccccaaagagacg-3' L 5'- tcctttattccgcacgccgg -3'	1100	SCHACHERMAYR et al. (1994)
STS-Lr10	1AS	R 5'- gctcgtcatctccacagg -3' L 5'- acctcatgcccgatgtag -3'	850	SCHACHERMAYR et al. (1997)
STS-Lr24	3DL	R 5'- agtcgtccccgaagaccgctgga -3' L 5'- tcgtcccctgatgccatgtaatgt -3'	350	DEDRYVER et al. (1996)
SCAR-Lr24	3DL	R 5'- tctagtctgtacatgggggc -3' L 5'- tggcacatgaactccatcacg -3'	700	SCHACHERMAYR et al. (1995)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene de resistência à ferrugem da folha *Lr1* é originário do próprio genoma do trigo hexaplóide e foi descrito por AUSEMUS et al. (1946). MCINTOSH et al., (1965) mapeou este gene na região distal do braço longo do cromossomo 5D. FEUILLET et al. (1995) desenvolveram um marcador STS a partir da conversão de um marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que, na população desenvolvida, co-segrega com este gene. A análise deste marcador STS em 25 cultivares brasileiras de trigo com conhecida presença ou ausência deste gene mostrou amplificação em 21 cultivares, incluindo os cultivares IAC5 e Peladinho, que não possuem o gene *Lr1* (Tabela 1, Figura 1). URBANOVICH et al. (2006), analisando este marcador STS em 68

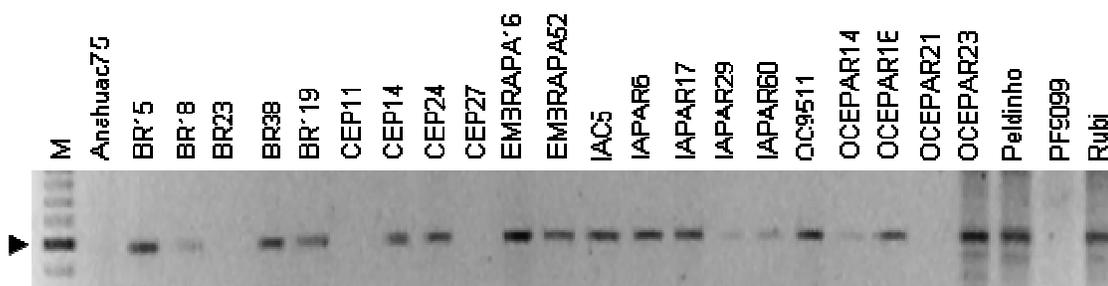


Figura 1 – Gel de agarose com o padrão de amplificação do marcador STS-Lr1. A amplificação nos cultivares IAC-5 e Peladinho demonstra que este marcador não é específico para o gene *Lr1* nos cultivares brasileiros de trigo. A seta à esquerda da figura indica o fragmento de 560 pb potencialmente associado ao gene *Lr1*. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.

genótipos oriundos de várias regiões do mundo (exceto Brasil), também observou a amplificação do fragmento de tamanho esperado em genótipos com ausência do gene. CHELKOWSKI et al. (2003), analisando este mesmo marcador em diferentes isolinhas do cultivar Thatcher, também observou que este marcador não era específico para as linhagens com o gene *Lr1*. Estes dados corroboram

com os encontrados em nosso trabalho, confirmando que este marcador não apresenta potencial de uso em seleção assistida para o gene *Lr1* em populações recombinantes diferentes das quais foi desenvolvido.

Tabela 2 – Postulação* dos genes *Lr* nos cultivares brasileiros de trigo em estudo e padrão da distribuição dos marcadores PCR-específicos associados a estes genes. As células sombreadas indicam cultivares em que o gene não foi postulado, mas foram positivos para o marcador.

Cultivar	Lr1	STS-Lr1	Lr9	STS-Lr9	Lr10	STS-Lr10	Lr24	STS-Lr24	SCAR-Lr24
Anahuac75	+	-	-	-	+	+	-	-	-
BR15	+	+	-	-	+	+	-	-	-
BR18	+	+	-	-	+	-	-	-	-
BR23	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BR38	-	+	-	-	-	-	+	+	+
BR119	+	+	-	-	+	-	-	-	-
CEP11	+	-	-	-	+	-	-	-	-
CEP14	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CEP24	+	+	+	-	+	-	+	-	-
CEP27	+	-	+	-	+	+	+	-	-
EMB16	-	+	-	-	-	-	+	-	-
EMB52	-	+	-	-	-	-	+	-	-
IAC5	-	+	-	-	-	-	-	-	-
IAPAR6	+	+	-	-	+	+	-	-	-
IAPAR17	+	+	-	-	+	+	-	-	-
IAPAR29	+	+	-	-	+	-	-	-	-
IAPAR60	+	+	-	-	+	-	-	+	+
OC9511	+	+	-	-	+	+	-	-	-
OCEPAR14	+	+	-	-	+	+	-	-	-
OCEPAR16	+	+	-	-	+	+	-	-	-
OCEPAR21	+	-	-	-	+	+	-	-	-
OCEPAR23	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Peladinho	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PF9099	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Rubi	+	+	-	-	+	-	+	+	+

* postulação de acordo com ZOLDAN (1998)

O gene *Lr9*, originário de *Aegilops umbellulata*, foi introduzido no trigo hexaplóide por SEARS (1956) e posteriormente mapeado no braço longo do cromossomo 6B (SEARS, 1961). Um marcador STS que segrega a 8 cM deste gene foi desenvolvido pela conversão de um marcador RAPD (*Random*

Amplification of Polymorphic DNA) (SCHACHERMAYR et al., 1994). A análise deste marcador nos cultivares brasileiros de trigo revelou que dentre os três cultivares com conhecida presença do gene *Lr9* (CEP14, CEP24 e CEP27), o cultivar CEP14 apresentou amplificação do fragmento de tamanho esperado (Tabela 1, Figura 2). Nenhum dos cultivares com ausência do gene *Lr9* apresentou amplificação de fragmento de tamanho esperado. BLASZCZYK et al. (2004) testaram este marcador em um grupo de genótipos com conhecida presença e ausência do gene *Lr9* em sete diferentes laboratórios europeus. Em



Figura 2 – Gel de agarose com o padrão de amplificação do marcador STS-Lr9. Somente os cultivares CEP14, CEP24 e CEP27 apresentam o gene *Lr9*. A ausência do fragmento de tamanho esperado em todos os cultivares com ausência do gene *Lr9* e presença na cultivar CEP14 demonstra alto potencial de uso deste marcador para seleção assistida para o gene *Lr9* presente no cultivar CEP14. A seta à esquerda da figura indica o fragmento de 1100 pb potencialmente associado ao gene *Lr9*. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.

todos, os resultados foram iguais, mostrando a robustez deste marcador. Vários outros trabalhos têm sido publicados relatando a especificidade deste marcador STS em identificar plantas contendo o gene *Lr9* (SINGH et al., 2003; STEPIEN et al., 2003). Em todos estes trabalhos, em nenhuma planta com ausência do gene *Lr9* o marcador apresentou amplificação. O mesmo ocorreu em nosso trabalho, mostrando que esse marcador apresenta grande potencial para uso em seleção assistida para o gene *Lr9* em programas de melhoramento de trigo no Brasil.

O gene *Lr10* é originário do genoma do próprio trigo hexaplóide e está mapeado no braço curto do cromossomo 1A (DICKY et al., 1971). Um marcador STS foi desenvolvido pela conversão de um marcador RFLP que co-segrega com este gene (SCHACHERMAYR et al., 1997). Em nosso trabalho, este marcador apresentou amplificação em 11 dos 17 cultivares com presença do gene *Lr10* (Tabela 2, Figura 3). Nenhum dos cultivares com ausência do gene *Lr10* apresentou amplificação, mostrando alto potencial de uso na seleção assistida. STEPIEN et al. (2003), analisando 37 cultivares européias de trigo, também concluem que o este marcador é eficiente na identificação de cultivares contendo o gene *Lr10*. O teste deste marcador em sete diferentes laboratórios europeus também comprova a eficácia deste marcador (BLASZCZYK et al., 2004).

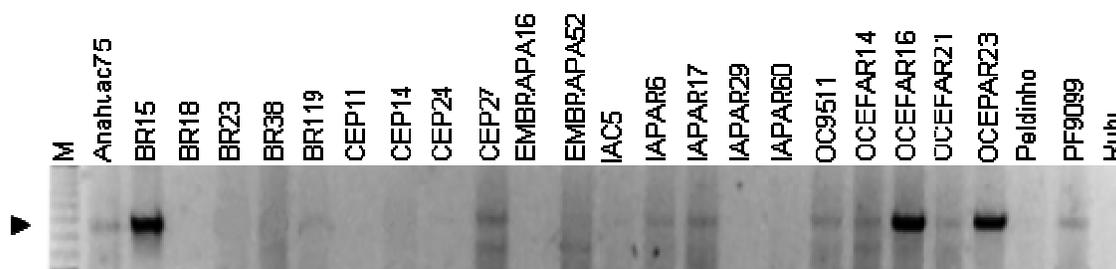


Figura 3 – Gel de agarose com o padrão de amplificação do marcador STS-Lr10. Observe a ausência do fragmento de tamanho esperado em todos os cultivares com ausência do gene *Lr10* (BR23, BR38, CEP14, EMBRAPA16, EMBRAPA52, IAC5 e Peladinho) e a amplificação na maioria dos cultivares com o gene *Lr10*. Este padrão de amplificação demonstra grande potencial de uso deste marcador para seleção assistida para o gene *Lr10* nos cultivares brasileiros de trigo. A seta à esquerda da Figura indica o fragmento de 850 pb potencialmente associado ao gene *Lr10*. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.

O gene *Lr24* foi transferido para o trigo hexaplóide do *Agropyrum elongatum* por translocação de parte do cromossomo 3D (SMITH et al., 1968). Dois marcadores PCR-específicos foram desenvolvidos associados a este gene, sendo um SCAR (SCHACHERMAYR et al., 1995) e um STS (DEDRYVER et al., 1996).

A análise do marcador SCAR nos cultivares brasileiros de trigo mostrou que dentre os sete cultivares no qual o gene *Lr24* foi postulado, em três este apresentou amplificação (Tabela 2, Figura 4a). O marcador STS apresentou amplificação nos mesmos três cultivares (Tabela 2, Figura 4b). Ambos os marcadores apresentaram amplificação no cultivar IAPAR60 no qual o gene não foi postulado. As análises destes marcadores em 37 genótipos europeus de trigo (STEPIEN et al., 2003), em um grupo de isolinhas (CHELKOWSKI et al. 2003) e

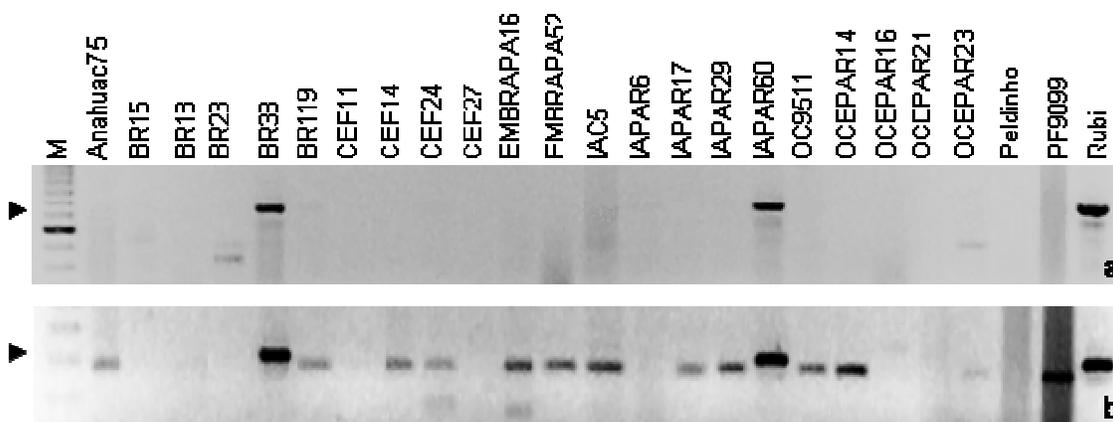


Figura 4 – Gel de agarose com o padrão de amplificação dos marcadores associados ao gene *Lr24*. a) Padrão de amplificação do marcador SCAR-Lr24 STS-Lr24. b) Padrão de amplificação do marcador STD-Lr24. Ambos os marcadores apresentaram amplificação nos mesmos cultivares. Em BR38 e Rubi foi postulado o gene *Lr24*. Já em IAPAR60 o gene *Lr24* não foi postulado, no entanto há a possibilidades de este cultivar conter o gene *Lr24*. A seta à esquerda da figura indica os fragmentos de 700 (a) e 350 (b) pb potencialmente associado ao gene *Lr24*. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.

em genótipos de trigo de várias regiões do mundo (URBANOVICH et al., 2006) demonstram a especificidade destes marcadores em identificar somente plantas contendo o gene *Lr24*. ZOLDAN (2002) afirma que IAPAR60 apresenta outros genes de resistência à ferrugem da folha que não foram possíveis postular. Os resultados aqui apresentados nos levam a concluir que o cultivar IAPAR60 possui

o gene *Lr24*. Assim, estes dois marcadores PCR-específicos têm grande potencial de uso na seleção assistida para o gene *Lr24* no Brasil.

Os genes *Lr1* e *Lr10* são os mais comuns nos cultivares brasileiros de trigo (ZOLDAN, 1998). Estes genes não têm mostrado alta eficiência na resistência quando sozinhos ou combinados entre si, no entanto parecem influenciar positivamente na resistência quando combinados com outros genes *Lr* (MACINTOSH et al., 1995). Embora o gene *Lr9* não esteja amplamente distribuído nos genótipos cultivados, devido à presença de um *linkage drag* oriundo de *Aegilops umbellulata* levar a uma diminuição no rendimento (ORTELLI et al., 1996), este tem sido muito efetivo contra a ferrugem da folha nos países europeus (URBANOVICH et al., 2006). Outro aspecto interessante deste gene é que, na combinação com o gene *Lr24*, tem sido altamente efetivo na resistência à ferrugem da folha (ROELFS et al. 1992). No Brasil este gene tem sido pouco explorado, pois está presente somente em três cultivares (Tabela 2). O marcador aqui validado associado ao gene *Lr9* facilitará a introdução deste em novos cultivares de trigo e a combinação deste com outros genes de resistência.

Os marcadores aqui validados associados aos genes *Lr9*, *Lr10* e *Lr24* são específicos para cultivares que apresentam estes genes, no entanto há cultivares com presença do gene e ausência do marcador (Tabela 2 e Figura 1, 2, 3, 4a e 4b). Desta maneira, o uso deste marcador está limitado aos cruzamentos onde os cultivares são contrastantes para o gene e o marcador. Em cruzamentos onde os cultivares não foram avaliados é recomendada uma avaliação prévia do marcador para verificar a amplificação no cultivar resistente e ausência de amplificação no cultivar suscetível. O marcador STS-Lr24 apresenta uma banda nos cultivares

suscetíveis de tamanho muito próximo ao fragmento associado ao gene *Lr9* (Figura 4b). Assim é recomendado a resolução dos produtos de amplificação deste marcador em gel de agarose no máximo a 1% e um tempo de corrida de no mínimo duas horas a 110 volts.

Os marcadores aqui validados representam uma nova ferramenta que poderá auxiliar os melhoristas brasileiros de trigo na obtenção de novos cultivares com resistência à ferrugem de folha de forma rápida, precisa e com baixo custo, podendo assim, contribuir para o alcance da auto-suficiência da produção de trigo no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSEMUS, E. R.; HARRINGTON, J. B.; REITZ, L. P. & WORZELLA, W. W. A Summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheats. **J. Am. Soc. Agron.** 38: 1082–1099, 1946.
- BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. & ROELFS, A. P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. **Summa Phytopathol.** 23: 101-111, 1997.
- BLASZCZYK L.; TYRKA, M. & CHEŁKOWSKI, J. *PstI*AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat. **J. Appl. Genet.** 46: 357-364, 2005.
- CHEŁKOWSKI, J.; GOLKA, L. & STĘPIEŃ. Ł. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. **J. Appl. Genet.** 44: 323-338, 2003.
- DA-SILVA, P. R. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo.** 2002, 64 p. Dissertação da Mestrado. Programa de Pós-Graduação e Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.
- DEDRYVER, F.; JUBIER, M. F.; THOUVENIN, J. & GOYEAU, H. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. **Genome**, 39: 830-835, 1996.
- DYCK, P. L. & KERBER, E. R. Chromosome location of three genes for leaf rust resistance in common wheat. **Can. J. Genet. Cytol.** 13: 480–483, 1971.
- FEUILLET, C.; MESSMER M.; SCHACHERMAYR G. & KELLER B. Genetic and physical characterization of the *Lr1* leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Mol. Gen. Genet.** 248: 553–562, 1995.
- MCINTOSH, R. A.; BEKER, E. P.; & DRISCOLL, C. J. Cytogenetical studies in wheat. I. Monosomic analysis of leaf rust resistance in the cultivars Uruguay and Transfer, **Aust. J. Biol. Sci.** 18: 971–977, 1965.

- MCINTOSH, R. A.; WELLINGS, C. R.; & PARK, R. F. **Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes**, Melbourne: SIRO, 1995.
- MCINTOSH, R.A.; APPELS, R.; DEVOS, K. M.; DUBCOVSKY, J.; ROGERS, W.J. & YAMAZAKI, Y. Catalogue of gene symbols for wheat. **Proc. 10TH Intern. Wheat Genet. Symp. Paestum Italy** (2003).
- MURRAY, M. & THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.** v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- NELSON, R. R. Genetics of horizontal resistance to plant disease. **Annu. Rev. Phytopathol.** 16: 359-378. 1978.
- ORTELLI, S.; WINZELER, H.; WINZELER, M.; FRIEDY, P. M. & NOSBERGER, J. Leaf rust resistance gene *Lr9* and winter wheat yield reduction: I. Yield and Yield Components, **Crop Sci.** 36: 1590–1595, 1996.
- ROELFS, A. P.; SINGH, R. P. & SAARI, E. E. Rust diseases of wheat: **Concepts and Methods of Disease Management**, Mexico: CIMMYT, 1992.
- SCHACHERMAYR, G. M.; MESSMER, M. M.; FEUILLET, C.; WINZELER, H.; WINZELER, M. & KELLER, B. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat, **Theor. Appl. Genet.** 90: 982–990, 1995.
- SCHACHERMAYR, G.; SIEDLER, H. & GALE, M. D. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. **Theor. Appl. Genet.** 88: 110–115, 1994.
- SCHACHERMAYR, G.; FEUILLET, C. & KELLER, B. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds, **Mol. Breed.** 3: 65–74, 1997.
- SEARS, E. R. Identification of the wheat chromosome carrying leaf rust from *Aegilops umbellulata*, **Wheat Inform. Serv.** 12: 12–13. 1961.
- SEARS, E. R., The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* into wheat Neurospora. **Brookhaven Symp. Biol.** 9: 1–21, 1956.
- SILVA, A. R. **Melhoramento para resistência do trigo às doenças e às pragas. In: Reunião Latinoamericana do trigo**, Porto Alegre:56-76, 1974.
- SINGH, R.; TIWARI, R. & DATTA, D. Detection of leaf rust resistance genes *Lr9* and *Lr10* in wheat (*Triticum aestivum*) by PCR based STS markers. **Acta Phytopathol. Entomol. Hungar.** 38: 245–249, 2003.
- SMITH, E. L.; SCHLEHUBER, A. M.; YOUNG, H. C. & EDWARDS, L. H. Registration of “Agent” Wheat. **Crop Sci.** 8: 511–512, 1968.
- STĘPIEŃ, Ł.; GOLKA, L. & CHEŁKOWSKI, J. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. **J. Appl. Genet.** 44: 193-149, 2003.
- URBANOVICH, O. Y.; MALYSHEV, S. V.; DOLMATOVICH, T. V. & KARTEL, N. A. Identification of leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using molecular markers **Russ. J. Genet.** 42: 546–554, 2006.
- ZOLDAN, S. M. Identificação de genes de resistência à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell). **Dissertação Mestrado**, UPF, Passo Fundo, 1998.

CAPÍTULO III

Identificação de seqüências genômicas em linhagens diferenciais de trigo potencialmente associadas à resistência à ferrugem da folha

Paulo Roberto Da Silva

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul e Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Patussi Brammer

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-Trigo

Luiz Carlos Federizzi

Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Cristina Kothe Milach

Pioneer Sementes

INTRODUÇÃO

As epidemias de doenças fúngicas nas lavouras tritícolas do Brasil têm sido um dos fatores críticos nas frustrações da produtividade, contribuindo para a redução da área cultivada, instabilidade das colheitas e aumento da evasão de divisas devido à necessidade de importação do produto. Dentre as doenças fúngicas que causam maiores prejuízos, está a ferrugem da folha do trigo, que é causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss (ANIKSTER *et al.*, 1997). O controle de doenças fúngicas tem sido feito com o uso de produtos químicos, o que leva a um aumento considerável do custo de produção, além de envolver riscos para a saúde humana e para o equilíbrio ecológico. Diante disso, o uso da resistência genética é o método mais eficiente e econômico de controle (MORAES-FERNANDES, 1987).

Em trigo, há resistência em fase de plântula e de planta adulta (BARCELLOS *et al.*, 1997). A que apresenta maior importância é a resistência de planta adulta, pois é nesta fase que ocorre maior desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, maiores prejuízos para a planta. A resistência ainda pode ser completa ou parcial. A resistência completa é conferida por genes de efeito maior no fenótipo e geralmente se manifesta em fase de plântula. Esta geralmente mantém-se por um período muito curto, devido a alta pressão de seleção que exerce sobre o patógeno, o que leva a rápida quebra da resistência. Exemplo disso ocorreu com os cultivares Tifton e CEP14, que se tornaram suscetíveis um ano após o lançamento (BARCELLOS *et al.*, 1997). Já a resistência parcial é geralmente conferida por mais de um gene e se expressa em fase adulta. Esse tipo de resistência não elimina o patógeno completamente e sim interfere na sua

taxa de desenvolvimento e reprodução. Assim, a resistência parcial permite a sobrevivência do patógeno, mantendo-o em um nível baixo, o qual não chega a causar dano à planta. A grande vantagem deste tipo de resistência está no fato dela exercer uma pressão de seleção menos intensa sobre o patógeno e, conseqüentemente, resultar em maior durabilidade (JOHNSON, 1984).

Atualmente a melhor perspectiva do melhoramento para controle da ferrugem da folha consiste em empregar combinações de genes independentemente de serem genes de efeitos maiores ou menores no fenótipo. ROELFS et al. (1992) sugeriu que *Lr12* e *Lr13*, ambos genes de planta adulta, poderiam, em combinações com *Lr34*, serem a base para a maioria da resistência durável observada em grande parte dos genótipos disponíveis. A combinação conferida pelos genes *Lr13* e *Lr34* tem sido muito eficaz, principalmente em combinação com genes que conferem resistência em fase de plântula (ROELFS et al., 1992).

O genoma do trigo é aproximadamente 35 vezes maior que o genoma do arroz, sendo um dos maiores entre as plantas cultivadas (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991). Aproximadamente 95 a 99% deste genoma é composto por seqüências não transcritas consistindo principalmente de retrotransposons e DNA repetitivo (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991, SANMIGUEL ET AL., 1996; WENDEL, 2000; SANDHU & GILL, 2002). O restante 1 a 5% é a parte do genoma denominada regiões ricas em genes, organizadas em ilhas gênicas variando em tamanho e em quantidade de genes (MUHARREN et al., 2003). Devido a esta complexa organização genômica, a melhor estratégia para a marcação e isolamento de genes em trigo envolveria técnicas que trabalham somente com a

parte expressa do genoma ou diretamente nas regiões ricas em genes. Uma das técnicas amplamente utilizadas para este fim é baseada no uso de *primers* degenerados desenhados a partir de motivos conservados na região NBS dos genes de resistência (KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996; SPIELMEYER et al., 1998; COLLINS et al., 2001; CORDEIRO & SKINNER, 2002; HUETTEL et al. 2002; CORTESE et al. 2003; RAMALINGAM et al., 2003; WENKAI et al., 2006). No entanto, quando se trabalha com genes que conferem resistência ampla e durável, esta técnica parece não ser viável, uma vez que estes genes parecem não apresentar regiões NBS (LI et al., 1999).

Em trigo, foi desenvolvida uma série de linhagens diferenciais da cultivar Thatcher contrastantes para genes de resistência à ferrugem da folha. Desta maneira, a diferença entre estas linhagens é mínima, podendo estar quase que exclusivamente na região onde se encontra o gene transferido. Quando se trabalha com a técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (VOS et al., 1995) na busca de marcadores moleculares associados a uma característica de interesse, identifica-se um grande número de bandas distribuídas aleatoriamente no genoma em estudo. A possibilidade de combinar o uso de linhagens diferenciais, que apresentam diferenças mínimas no genoma, com a técnica de AFLP, poderá permitir a identificação de seqüências associadas aos genes de interesse sem a necessidade de análise de todo o genoma de maneira rápida e mais precisa. Assim, este trabalho teve o objetivo de identificar marcadores moleculares AFLP potencialmente associados aos genes de resistência à ferrugem da folha em trigo, *Lr13* e *Lr34*, utilizando linhagens diferenciais contrastantes para estes genes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Para a identificação de seqüências potencialmente associadas aos genes *Lr13* e *Lr34* pela técnica de AFLP, foram utilizadas três linhagens diferenciais da cultivar Thatcher e a cultivar BR23. A linhagem Thatcher-*Lr13* possui o gene *Lr13*, a linhagem diferencial Thatcher-*Lr34* possui o gene *Lr34* e a linhagem Thatcher-*Lr13+Lr34* possui ambos os genes. Estes genes foram transferidos para estas linhagens por retrocruzamentos. O cultivar BR23 possui sete genes de resistência em fase de plântula à ferrugem da folha e também os genes de resistência de planta adulta *Lr13* e *Lr34* (ZOLDAN & BARCELLOS, 2002). Para o mapeamento físico das seqüências obtidas foi utilizada uma série de 18 linhagens nulitetrassômicas da variedade Chinese Spring cedidas pelo Dr. John Flintham, do John Innes Centre, Norwich, Reino Unido.

Extração de DNA e AFLP

O DNA do cultivar BR23 e das linhagens diferenciais e nulitetrassômicas foi extraído de acordo com o protocolo proposto por MURRAY & THOMPSON (1980), com as seguintes modificações: aproximadamente 50 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 600 µl de tampão de extração (CTAB 1% (w/v), 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) pré-aquecido a 65°C. O tecido foi incubado a 65°C no tampão de extração por 60 minutos. O DNA foi separado dessa solução através de uma solução de fenol-

clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação. O DNA foi precipitado em etanol a -20°C, ressuspensão em TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), tratado com RNase A e, depois de seco, solubilizado em água ultrapura. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™). As reações de AFLP foram conduzidas de acordo com Vos et al. (1995), com pequenas modificações. Duzentas nanogramas de DNA de cada amostra (cultivar BR23 e isolinhas Thatcher-*Lr13*, Thatcher-*Lr34* e Thatcher-*Lr13+Lr34*) foram digeridos separadamente com duas enzimas de restrição, 5U *MseI* e 5U *PstI*. Os fragmentos gerados pela restrição foram ligados nos adaptadores *PstI* e *MseI* (25 µM do adaptador *MseI* e 2.5 µM do adaptador *PstI*), usando um tampão de ligação contendo ATP, 1U de T4 DNA ligase e água ultrapura para completar 50 µl. A pré-amplificação foi conduzida utilizando *primers* complementares aos adaptadores *PstI* e *MseI* contendo uma base seletiva. A amplificação seletiva foi conduzida também com *primers* complementares aos adaptadores *PstI* e *MseI*, no entanto com três bases seletivas e utilizando como molde o produto da pré-amplificação. Para amplificação seletiva foram utilizadas 60 combinações de *primers*. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 6% e visualizados por coloração com nitrato de prata conforme protocolo “Silver Sequence TM” da Promega Corporation.

Identificação de fragmentos de interesse, clonagem e seqüenciamento

Para clonagem foram selecionados os fragmentos que apresentavam os seguintes padrões: padrão I) presença em Thatcher *Lr13*, Thatcher *Lr13+Lr34* e BR23 e ausência em Thatcher *Lr34*; padrão II) presença em Thatcher *Lr34*,

Thatcher *Lr13+Lr34* e BR23 e ausência em Thatcher *Lr13*. Os fragmentos que apresentaram cada um dos dois padrões foram extraídos do gel poliacrilamida, reamplificados e clonados. Para a extração do fragmentos do gel estabeleceu-se o seguinte protocolo: umidificação e retirada de parte do gel com o fragmento de interesse com o auxílio de uma lâmina estéril; embebimento em 10 µl de água ultrapura; esmagamento do gel contendo o fragmento e retirada do líquido resultante do esmagamento. Para reamplificação, após a etapa de purificação foi feita uma PCR utilizando o protocolo de amplificação seletiva para AFLP. Nesta reação substituímos o DNA pelo líquido obtido no protocolo de purificação. Após a PCR, as amostras foram resolvidas em gel de agarose 3% e visualizadas por coloração com brometo de etídio. As imagens foram digitalizadas por meio do Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (EDAS, Kodak Digital Science®). Para Clonagem, os fragmentos foram ligados no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen). Em seguida, os vetores híbridos foram inseridos em células competentes (*E. coli*, linhagem TOP10) por choque térmico. As células foram crescidas por 16 horas em placas contendo meio LB/ágar com ampicilina. Para extração dos plasmídeos, os clones selecionados foram crescidos em meio líquido com ampicilina por 16 horas. O seqüenciamento dos plasmídeos foi realizado pela técnica de terminação da cadeia e as seqüências de bases lidas em seqüenciador automático (ABI 310, Applied Biosystems).

***BLAST search*, mapeamento *in silico* e mapeamento físico**

Após obtidas as seqüências, foi realizado *BLASTn* contra o banco de nucleotídeos e de EST (*Expressed Sequence Tag*) (*est-others*) do NCBI (*National*

Center for Biotechnology Information) e EBI (*European Bioinformatics Institute*). O mapeamento *in silico* foi realizado por *BLASTn* contra o banco de seqüências mapeadas do *GrainGenes* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) e do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para o mapeamento físico foi necessária a conversão dos marcadores AFLP em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*). Para isto, foi desenhado um par de *primer* para cada seqüência utilizando o programa *Primer3* (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Estes *primers* foram utilizados para determinar a localização destas seqüências nos cromossomos por PCR utilizando 18 linhagens nulitetrassômicas. Para a PCR com os marcadores SCAR uma solução contendo os seguintes componentes foi preparada: tampão para PCR (Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,8 mM de cada), *primer* direto (250 nM), *primer* reverso (250 nM), *Taq* polimerase (1 U), DNA (60 ng) e água ultrapura até completar um volume de 25 µl. A programação do termociclador foi: 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 2 minutos a 72°C e um passo final de 10 min a 72°C. Após a PCR, as amostras foram resolvidas em gel de agarose 1,5% e visualizadas por coloração com brometo de etídio. As imagens foram digitalizadas por meio do *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (EDAS, Kodak Digital Science®).

Avaliação do potencial das seqüências identificadas como marcadores moleculares

Para avaliar a potencialidade do uso destas seqüências como marcadores moleculares, os *primers* desenvolvidos para os marcadores SCAR foram

avaliados por PCR no cultivar BR23, nas linhagens diferenciais Thatcher *Lr13*, Thatcher *Lr34* e Thatcher *Lr13+Lr34*. O protocolo de amplificação e as condições da PCR foram de acordo com o estabelecido para o mapeamento físico dos SCARs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AFLP

As 63 combinações de *primer* AFLP utilizadas geraram aproximadamente seis mil bandas. Destas, 19 bandas apresentaram os padrões esperados sendo, 10 com padrão I, ou seja, presença em Thatcher-*Lr13*, Thatcher-*Lr13+Lr34* e BR23 e ausência em Thatcher-*Lr34* e nove com padrão II, ou seja, presença em Thatcher-*Lr34*, Thatcher-*Lr13+Lr34* e BR23 e ausência em Thatcher-*Lr13* (Figura 1). A técnica de AFLP tem a capacidade de gerar uma grande quantidade de bandas e conseqüentemente alto polimorfismo (VOS et al., 1995). Em média, quando comparando dois indivíduos da mesma espécie, uma combinação de *primers* é capaz de gerar de 100 a 200 bandas,

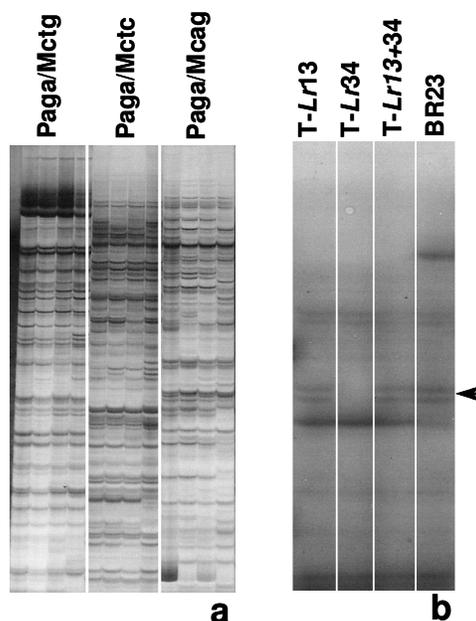


Figura 1 – Gel de poliacrilamida com o padrão das amplificações das combinações de primers AFLP. **a)** Visão geral de três combinações de primers. **b)** Aumento de uma região amplificada pela combinação de primers Pacc/Mcgc mostrando uma banda de 150 pb (seta) com potencial de estar associada ao gene *Lr13*.

sendo que o número de bandas polimórficas tem sido em torno de 10% para trigo e aveia (BOFF, 2006; BARBOSA et al., 2006). No trabalho aqui desenvolvido obtivemos em torno de 100 bandas por combinação de *primers*. No entanto, a porcentagem de bandas polimórficas foi inferior a 0.4%, o que era esperado devido a grande similaridade entre as linhagens diferenciais. Após purificação, reamplificação, clonagem e seqüenciamento, das 19 bandas com padrão esperado foram obtidas seqüências com boa qualidade de 11, sendo, seis potencialmente associadas ao gene *Lr13* e cinco ao gene *Lr34* (Tabela 1).

Tabela 1 – Combinações de *primers* derivados de AFLP que apresentaram padrão esperado e sua localização cromossômica pela análise em nulitetrassômicos.

Combinação	Thatcher- <i>Lr13</i>	Thatcher- <i>Lr34</i>	Thatcher- <i>Lr13+Lr34</i>	BR23	Cromoss.
Paaa/Mcac	+	-	+	+	*
Paag/Mctg	+	-	+	+	*
Paag/Mcca	+	-	+	+	&
Pacc/Mcgc	+	-	+	+	&
Paac/Mcag	+	-	+	+	*
Pacc/Mctg	+	-	+	+	*
Pacg/Mctg	-	+	+	+	*
Pacc/Mcag	-	+	+	+	*
Pacg/Mccg	-	+	+	+	3B
Paca/Mcgg	-	+	+	+	*
Patc/Mcgg	-	+	+	+	3B

*amplificação em todas as linhagens & não amplificou

Mapeamento e Blast search

Cada SCAR desenvolvido para as 11 seqüências foi testado nas 18 linhagens nulitetrassômicas com o objetivo de localizar fisicamente estes marcadores nos cromossomos do trigo. Com esta estratégia foi possível mapear dois SCARs (Tabela 1), sendo ambos no cromossomo 3B. O gene *Lr13* está mapeado no

cromossomo 2B (DYCK et al., 1966) e o gene *Lr34* no cromossomo 7D (DYCK, 1987). Por estes SCARs estarem em cromossomos diferentes, podemos afirmar que não apresentam potencial de estarem associados a estes genes. Dois SCARs não apresentaram amplificação em nenhuma das linhagens. Provavelmente isto ocorre por este cultivar não apresentar a região de anelamento dos *primers*, uma vez que a cultivar no qual foram desenvolvidas as linhagens nulitetrassômicas é diferente da que foi usada para a obtenção das seqüências, podendo haver pequenas diferenças em seu genoma. Sete seqüências apresentaram amplificação em todas as linhagens. Estas seqüências podem estar em um dos três cromossomos (2A, 4B, 6D) das linhagens nulitetrassômicas não analisadas. A análise por *BLAST* contra o banco de seqüências mapeadas do GrainGenes e NCBI não identificou seqüências mapeadas com homologia significativa.

Com a comparação das seqüências obtidas por *BLASTn* contra o banco de nucleotídios e de EST (*Expressed Sequence Tag*) do NCBI, foi possível caracterizar as seqüências de acordo com sua possível função (Tabela 2). Em geral a técnica de AFLP amplifica aleatoriamente regiões do genoma em estudo (VOS et al., 1995). Considerando que as regiões não transcritas estão geralmente metiladas, o uso de enzimas sensíveis a metilação faz com que a técnica de AFLP torne-se mais específica para as regiões transcritas (BLASZCZYK et al., 2005). Em nosso trabalho usamos a enzima *Pst I* que é sensível a metilação. Isto refletiu diretamente nos resultados: das 11 seqüências, sete apresentaram homologia com seqüências previamente identificadas como expressas em trigo (Tabela 2). Três seqüências apresentaram homologia com seqüências

previamente identificadas em bibliotecas de resposta a estresse abiótico. Duas seqüências apresentaram homologia com seqüências identificadas em bibliotecas de resposta a doenças. A seqüência amplificada com a combinação Pacg/Mccg apresentou homologia com um canal de água identificado em cevada e também identificado em resposta a fusariose em trigo. JANTASURIYARAT et al. (2005), analisando duas bibliotecas de ESTs de arroz, sendo uma biblioteca oriunda de plantas inoculadas com o fungo causador da brusone e outra oriunda de plantas não inoculadas, identificou um canal de água como sendo altamente induzido em plantas inoculadas. MYSORE et al. (2003), analisando o perfil de expressão em plantas de tomate transgênicas super expressando o gene de resistência *Pto* em resposta a bacteriose, identificaram quatro genes que codificam canais de água com expressivo aumento na expressão. Estes dados sugerem que estes genes estão diretamente relacionados com resposta a doença, no entanto o papel exato dos canais de água na resistência ainda não foi elucidado. A seqüência aqui identificada, apesar de aparentemente apresentar função na resistência a doenças, não representa o loco ou parte do loco dos genes *Lr13* e *Lr34*, uma vez que esta seqüência foi mapeada em cromossomos diferentes dos que encontram-se estes genes. A seqüência amplificada pela combinação Pacc/Mcag apresentou homologia com seqüências identificadas em bibliotecas de resposta a fusariose. Esta seqüência, quando traduzida para aminoácidos, não apresentou nenhum códon de terminação, mostrando alto potencial de ser um gene. A realização de *BLASTp* com a ORF (*Open Reading Frame*) identificada contra o banco de proteínas do NCBI não apresentou homologia significativa. Já contra o banco de

proteínas do EBI, mostrou identidade de 84% com uma proteína hipotética de arroz (acesso número Q6Z371, e-value 3.8e-31).

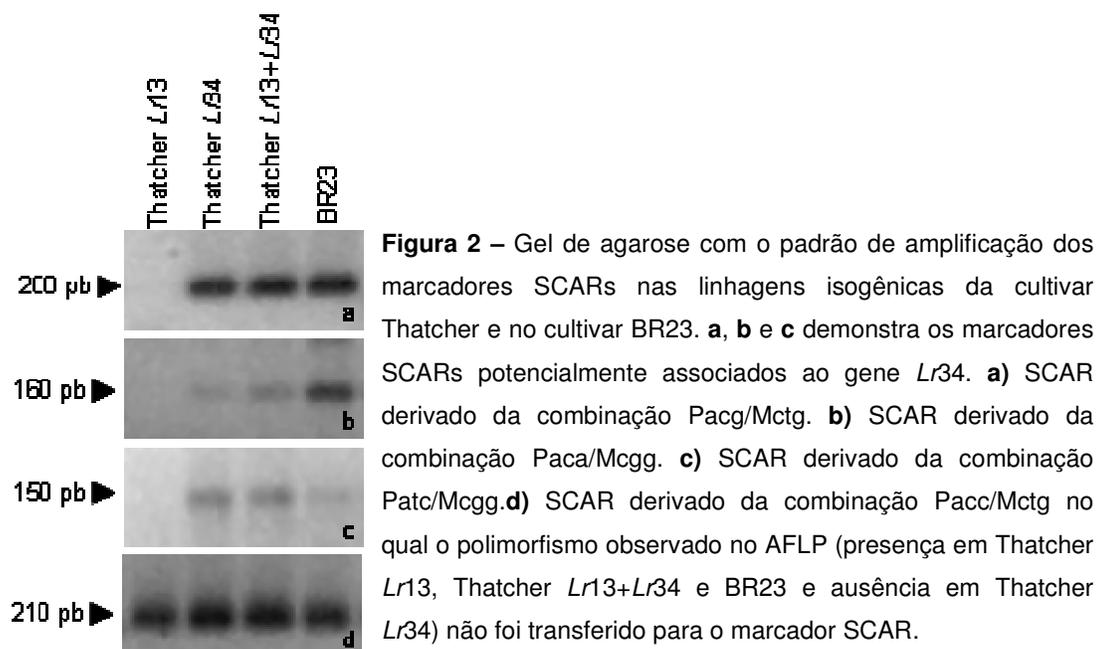
Tabela 2 - Resultado do *BLASTn* contra o banco de nucleotídeos e EST do NCBI

Combinação	Gene ou condição	Espécie	E-value	Nº de acesso
Pacc/Mcgc	resposta a frio	<i>T. aestivum</i>	1e-49	CV763775
Pacc/Mctg	resposta a doença	<i>T. aestivum</i>	3e-22	CN011593
Paac/Mcag	resposta a calor	<i>T. aestivum</i>	2e-47	AJ603122
Pacg/Mctg	resposta a frio e calor	<i>T. aestivum</i>	4e-123	CA602658
Pacg/Mccg	canal de água	<i>H. vulgare</i>	1e-39	AJ310639
	resposta à doença	<i>T. aestivum</i>	4e-37	BQ903743
Pacc/Mcag	EST	<i>T. aestivum</i>	3e-79	BJ269059
Paaa/Mcac	EST	<i>T. aestivum</i>	0.0001	BJ247204
Paca/Mcgg	-	-	-	-
Patc/Mcgg	-	-	-	-
Paag/Mctg	-	-	-	-
Paag/Mcca	-	-	-	-

Análise do potencial do uso dos SCARS desenvolvidos como marcadores moleculares

Dentre os 11 marcadores AFLP convertidos em marcadores SCAR, três (derivados das combinações Pacg/Mctg, Paca/Mcgg e Patc/Mcgg) mantiveram o polimorfismo observado nos marcadores AFLP (Figura 2). O restante dos marcadores SCARs desenvolvidos mostraram-se monomórficos. A perda de polimorfismo quando convertidos marcadores AFLP em PCR-específicos é comum em cereais com genoma grande. BLASZCZYK et al. (2005) trabalhando com trigo e utilizando a mesma estratégia, identificou marcadores AFLP potencialmente associados a dez genes de resistência à ferrugem da folha. Após a conversão destes marcadores AFLP em marcadores PCR-específicos, somente três mantiveram o polimorfismo. Desde a primeira publicação sobre o

desenvolvimento de marcadores AFLP em trigo (DONINI et al., 1997), poucos trabalhos têm sido publicados relatando a conversão deste tipo de marcador em marcador pcr-específico (QU et al., 1998; SHAN et al., 1999; PARKER & LANGRIDGE, 2000; PRINS et al., 2001; SMITH et al., 2002; GUO et al., 2003; BLASZCZYK et al., 2005). PRINS et al. (2001) relatam que os fragmentos amplificados por AFLP em trigo e cevada são os mais difíceis de serem



convertidos em marcadores pcr-específicos, devido ao grande número de duplicações nestes genomas. Outra dificuldade em reproduzir o polimorfismo do AFLP quando convertidos para marcadores pcr-específicos é que o polimorfismo do AFLP está baseado em inserções, deleções ou substituições de um a três nucleotídeos. SHAN et al. (1999) concluíram que a conversão de marcadores AFLP em PCR-específico em trigo é um processo ineficiente, devido ao pouco sucesso de conversão que obtiveram (de 16 marcadores somente três foram convertidos). SMITH et al. (2003) para não perderem o polimorfismo do marcador

AFLP durante a conversão, desenharam o *primer* a partir da região do polimorfismo do AFLP, o que resultou na eficiente transferência do polimorfismo para o novo marcador PCR-específico. Em nosso trabalho três marcadores SCAR mantiveram o polimorfismo observado no AFLP (Figura 2). O marcador derivado da combinação Patc/Mcgg não apresenta potencial de estar associado a nenhum dos genes em estudo, isto por este marcador ter sido mapeado no cromossomo 3B e os genes *Lr13* e *Lr34* estarem em outros cromossomos. Já os marcadores SCARs derivados das combinações Paca/Mcgg e Pacg/Mctg têm grande potencial de estarem associados ao gene *Lr34*. A Avaliação destes marcadores em genótipos contrastantes para este gene no qual possui uma população segregante permitirá a confirmação desta associação.

A identificação em nosso trabalho de dois marcadores SCAR potencialmente associados ao gene *Lr34* demonstra que o uso de linhagens diferenciais, combinada com a técnica de AFLP sensível à metilação, é uma estratégia eficiente para a exploração de regiões ricas em genes em trigo e identificação de seqüências expressas potencialmente associadas à resistência à ferrugem da folha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANIKSTER, Y.; BUSHNELL, W. R.; EILAM, T.; MANISTERSKI, J.; & ROELFS, A.P. *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. **Can. J. Bot.** 75: 2082-2096, 1997.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E. D. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. **Plant Mol. Biol. Rep.**9:211-215, 1991.
- BARBOSA, M. M.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K.; MARTINELLI, J. A. & THOME, G. C. H. Molecular mapping and identification of QTL's associated to oat crown rust partial resistance. **Euphytica**, 257: 269, 2006.
- BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. & ROELFS, A.P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. **Summa Phytopathologica**, 23: 101-111, 1997.

- BLASZCZYK L.; TYRKA, M. & CHELKOWSKI, J. *PstI* AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat. **J. Appl. Genet.** 46: 357-364, 2005.
- BOFF, T. Tolerância ao Alumínio em Trigo: **Identificação e Caracterização Molecular de Genes.** 2006, 184 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação e Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
- COLLINS, N. C.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J. & PRYOR, A. J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome**, 44: 375–381, 2001.
- CORDERO, J. C. & SKINNER, D.Z. Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1283-1289, 2002.
- CORTESE, M. R.; FANELLI, E. & DE GIORGI, C. Characterization of nematode resistance gene analogs in tetraploid wheat. **Plant Science**, 164: 71-75, 2003.
- DILBIRLIGI, M.; ERAYMAN, M.; SANDHU, D.; SIDHU, D. & GILL, K. S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. **Genetics**, 166: 461–481, 2004.
- DONINI, P.; ELIAS, M. L.; BOUGOURD, S. M. & KOEBNER, R. M. D. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. **Genome**, 40: 521-526, 1997.
- DYCK, P. L. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. **Genome** 29: 467-469, 1987.
- DYCK, P.L.; SAMBORSKY, D. J. & ANDERSON, L. G. Inheritance of adult plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. **Can. J. Genet. Cytol.** 8:665-671, 1966.
- GUO P. G.; BAI G. H. & SHANER, G. E. AFLP and STS tagging of major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 106:1011-1017, 2003.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. & PARKER, J. E. Deciphering plantpathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Curr. Opin. Biotechnol.** 14, 177–193, 2003.
- HUETTEL, B.; SANTRA, D.; MUEHLBAUER, F.J.; KAHL, G. Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. **Theor. Appl. Genet.** 105: 479-490, 2002.
- JANTASURIYARAT, C.; GOWDA, M.; HALLER, K.; HATFIELD, J.; LU, G.; STAHLBERG, E.; ZHOU, B.; LI, H.; KIM, H.; YU, Y.; DEAN, R. A.; WING, R. A.; SODERLUND, C. & WANG, G. L. Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. **Plant Physiology** 138: 105 – 115, 2005.
- JOHNSON, R. A. Critical analysis of durable resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 22: 309-330, 1984.
- KANAZIN, V.; MAREK L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 11746-11750, 1996.

- LI, W. L.; FARIS, J. D.; CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; HULBERT, S. H.; LIU, D. J.; CHEN, P. D. & GILL, B. S. Genomic mapping of defense response genes in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 98:226–233, 1999.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesq. Agropec. Bras.** 22:881-896, 1987.
- MURRAY, M. & THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.** 8: 4321-4325, 1980.
- PARKER, G.D. & LANGRIDGE, P. Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Breeding**, 6:169–174, 2000.
- PRINS, R.; GROENEWALD, J. Z.; MARAIS, G. F.; SNAPE, J. W. & KOEBNER, R. M. D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 103: 618-624, 2001.
- QU, L.J.; FOOTE, T. N.; RPBERTS, M. A.; MONEY, T. A.; ARAGÓN-ALCAIDE, L.; SNAPE, J. W.; & MOORE, G. A simple PCR-based method for scoring the *ph1b* deletion in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 96: 371-375, 1998.
- RAMALINGAM, J.; CRUZ, C. M. V.; KUKREJA, K.; CHITTOOR, J. M.; WU, J. L.; LEE, S. W.; BARAOIDAN, M.; GEORGE, M. L.; COHEN, M. B.; HULBERT, S. H.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Candidate Defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 16: 14-24, 2003.
- ROELFS, A. P.; SINGH, R. P. & SAARI, E. **Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management.** Mexico: CIMMYT. 81 p, 1992.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H.J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000.
- SANDHU, D.; SIDHU, D. & GILL, K. S. Identification of expressed sequence markers for a major gene-rich region of wheat chromosome group 1 using RNA Fingerprinting-Differential Display. **Crop Science**, 42: 1285-1290, 2002.
- SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z. & BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, 274: 765–768, 1996.
- SHAN, X.; BLAKE, T. K. & TALBERT, L. E. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. **Theor. Appl. Genet.** 98: 1072-1078, 1999.
- SMITH P. H.; KOEBNER R. M. D. & ; BOYD L. A. The development of a STS marker linked to a yellow rust resistance derived from the wheat cultivar Moro. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1278-1282, 2002.
- SPIELMEYER, W.; ROBERTSON, M.; COLLINS, N.; LEISTER, D.; SCHULZE-LEFERT, P.; SEAH, S.; MOULLET, O.; LAGUDAH, E. S. A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*) **GENOME**, 41: 782-788, 1998.
- VOS, HR.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPE, M. & ZABEAU, M. AFLP: a

- new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414, 1995.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant. Mol. Biol.** 42:225–249, 2000.
- WENKAI, X.; MINGLIANG, X.; JIUREN, Z.; FENGGE, W.; JIANSHENG, L.; JINGRUI, D. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays L.*). **Theor. Appl. Genet.** 113: 63-72, 2006.
- YU, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93:11751-11756, 1996.
- ZOLDAN, S. M. **Identificação de genes de resistência à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum L. em Thell*)**. 1998, 83p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade de Passo Fundo, 1998.

CAPÍTULO IV

Identificação e caracterização de análogos a genes de resistência em trigo

Paulo Roberto Da Silva

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul, Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Patussi Brammer

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-Trigo

Márcia Soares Chaves

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-Trigo

Luiz Carlos Federizzi

Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Cristina Kothe Milach

Pioneer Sementes

INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie alohexaplóide ($2n=6x=42$, AABBDD) que contém três gemomas homeólogos. Sendo 35 vezes maior que o genoma do arroz, o genoma do trigo é o maior entre as plantas cultivadas (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991). Aproximadamente de 95 a 99% deste genoma é composto por seqüências não transcritas, consistindo principalmente de retrotransposons e DNA repetitivo (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991; SANMIGUEL et al., 1996; WENDEL, 2000; SANDHU & GILL, 2002). O restante, 1 a 5%, é a parte do genoma denominada regiões ricas em genes e estas são organizadas em ilhas gênicas variando em tamanho e em quantidade de genes (ERAYMAN et al., 2004).

A incidência de doenças nas lavouras tritícolas causa uma perda anual que varia de 20 a 37% da produção mundial (PIMENTAL et al., 1997). Dentre as doenças fúngicas que causam maiores prejuízos à triticultura, está a ferrugem da folha do trigo, que é causada pelo fungo *Puccinia triticina* Erikss (ANIKSTER et al., 1997). Comprovadamente a resistência genética é a maneira mais eficiente e econômica de controle (ROELFS et al., 1992; BARCELLOS, 1994; MCINTOSH et al., 1995).

Até o momento, mais de 50 genes que conferem resistência a doenças (genes R) foram clonados em várias espécies de plantas. Estes genes são classificados em cinco classes de acordo com a presença de domínios específicos (BAKER et al., 1997). A maior destas classes é a que contém os genes que codificam para proteínas denominadas NBS-LRR. Estas proteínas apresentam um domínio central conservado com sítios de ligação a nucleotídeos

trifosfatados (domínio NBS) e um domínio C-terminal rico em repetições de leucina (domínio LRR) (WENKAI et al., 2006). O domínio NBS apresenta seis motivos: Quinase-1a (p-loop), quinase-2, quinase-3a, GLPL, RNBS-D e MHD (HOMMOND-KOSACK & JONES, 1997, MEYERS et al., 1999). Dentre estes, os motivos Quinase-1a (p-loop), quinase-2, quinase-3a são os que possuem maior nível de conservação apresentando as seguintes seqüências consenso; p-loop GxxxGxGK(T/S)T, quinase-2 LxxxDDVW e quinase-3a GxxxxTxR. Apesar destes motivos serem comuns a outras proteínas, as seqüências nas quais ocorrem e as disposições dos aminoácidos conservados são únicas nos genes R (HOMMOND-KOSACK & JONES, 1997, MEYERS et al., 1999). Em trigo, todos os genes clonados ou caracterizados (*Cre3*, *Yr10*, *Lr10*, *Lr21*, *Pm3b*) apresentam a região NBS com domínios conservados (LAGUDAH et al., 1997; SPIELMEYER et al., 2000; FEUILLET et al., 2003; HUANG et al., 2003; YAHIAOUI et al., 2004).

Devido à observação de que a maioria dos genes R clonados apresenta o domínio NBS (37 dos 50 clonados até o momento), o desenho de *primers* degenerados baseados em motivos conservados deste domínio tem sido amplamente utilizado para amplificação em massa de RGAs (Resistance Gene Analogues) em diversas espécies (KANAZIN et al., 1996; LEISTER et al., 1996; YU et al., 1996; SPIELMEYER et al., 1998; MAGO et al., 1999; COLLINS et al., 2001; CORDEIRO & SKINNER, 2002; HUETTEL et al., 2002; CORTESE et al., 2003, WENKAI et al., 2006). Em trigo, DILBIRLIG et al., (2003) identificaram 220 RGAs utilizando *data mining* e uma metodologia de *fingerprinting* de RNA modificada com uma combinação de *primers* poli-T e *primers* degenerados obtidos a partir de motivos da região NBS. O mapeamento de 164 destes RGAs

revelou que estes encontram-se agrupados em 26 regiões diferentes do genoma, regiões estas onde também estão mapeados 90 dos 110 genes de resistência fenotipicamente caracterizados em trigo (DILBIRLIGI et al., 2004).

A potencial função dos RGAs tem sido avaliada por análises genéticas. Como resultado, vários RGAs tem se mostrado associados a locos que conferem resistência a doenças em várias espécies (KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996; SPIELMEYER et al., 1998; COLLINS et al., 2001; CORDEIRO & SKINNER, 2002; HUETTEL et al. 2002; CORTESE et al. 2003; RAMALINGAM et al., 2003; WENKAI et al., 2006), e muitos desses co-segregam com genes de resistência, o que indica que representam parte funcional desses genes (LEISTER *et al.*, 1996; SHEN *et al.*, 1998; GARCIA-MAS *et al.*, 2001; BROTMAN *et al.*, 2002; HUETTEL *et al.*, 2002, SHEN et al., 2002). Em trigo o primeiro gene de resistência à ferrugem da folha (*Lr21*) foi clonado a partir de um marcador RGA que, em estudos de segregação, mostrava-se ligado ao gene (HUANG & GILL 2001). Após clonado, comprovou-se que este RGA era parte funcional do gene (HUANG et al., 2003). O mesmo ocorreu com um RGA identificado em alface, que foi comprovado ser parte funcional do gene *DM3* (SHEN et al., 2002). Esses resultados demonstram a potencialidade da exploração destes domínios conservados para isolar RGAs associados à resistência a doenças e desenvolver marcadores moleculares para a seleção assistida.

Considerando a complexidade do genoma do trigo e, diante disto, a necessidade de utilizar técnicas capazes de explorar diretamente as regiões de interesse neste genoma, este trabalho teve como objetivo a identificação e

caracterização de RGAs em trigo pela amplificação de regiões conservadas presentes nos genes de resistência, utilizando *primers* degenerados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

O cultivar de trigo BR-23, que segundo ZOLDAN (1998) possui, além dos genes *Lr13* e *Lr34*, mais sete genes para resistência à ferrugem da folha (*Lr26*, *Lr27*, *Lr31*, *Lr1*, *Lr14b*, *Lr23*, *T2*), foi utilizado para isolamento de RGAS utilizando *primers* degenerados. Para as análises moleculares, foram coletadas folhas sadias e com sintomas de ferrugem de diversas plantas em todos os estágios de desenvolvimento. Imediatamente após a coleta, as folhas foram imersas em nitrogênio líquido para posterior extração de DNA e RNA. Uma série de linhagens nulitetrassômicas da variedade Chinese Spring foi utilizada para o mapeamento físico dos RGAs. Para a avaliação da potencialidade como marcador molecular, 20 RGAs (Tabela 3) foram avaliados em 32 cultivares de trigo (Figura 7). A associação dos RGAS com a resistência à ferrugem da folha foi realizada pela análise em 45 linhagens de uma população duplo-haplóide, previamente fenotipada para o gene *Lr26* em fase de plântula, e para resistência de planta adulta. Esta população é derivada do cruzamento entre o cultivar de trigo BR-35 (portador dos genes *Lr26*, *Lr23*, *Lr1*, *Lr14b*, *Lr13*, *Lr34* e *T3*) e o cultivar IAC-13 (que não possui nenhum gene de resistência). Esta população foi utilizada devido não haver uma população oriunda de cruzamentos envolvendo a cultivar BR23, a qual foi utilizada para a identificação dos RGAs.

Extração de DNA e RNA e síntese de cDNA

O DNA das linhagens nulitetrassômicas da população duplo-haplóide e dos cultivares BR23, BR35 e IAC-13 foi extraído de coleótilos, de acordo com o protocolo proposto por MURRAY & THOMPSON (1980), com as seguintes modificações: aproximadamente 50 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 600 µl de tampão de extração (CTAB 1% (w/v), 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) pré-aquecido a 65°C. O tecido foi incubado a 65°C no tampão de extração por 60 minutos. O DNA foi separado dessa solução através de uma solução de fenol-clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação. O DNA foi precipitado em etanol a -20°C, ressuspenso em TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) e tratado com RNase A. Depois de seco, o DNA foi solubilizado em água ultrapura. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™). O RNA foi extraído, utilizando *plant RNA reagent* (Invitrogen), de uma mistura de folhas do cultivar BR23. Após extraído, o RNA foi suspenso em água ultrapura, quantificado em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™) e verificado a qualidade em gel de agarose 0,9%. A síntese do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit SuperScript II (Invitrogen). Para síntese da primeira fita, foram utilizados três *primers* poli-T₁₉, sendo que cada *primer* foi ancorado com uma base seletiva (A ou C ou G). Após a síntese da primeira fita, a segunda fita foi sintetizada utilizando como iniciadores os fragmentos de RNA presentes nas amostras, gerados pelo tratamento do produto da primeira fita com RNAase H.

Data mining e desenho de *primers* degenerados

Para amplificação dos RGAs em trigo foram utilizadas três combinações de *primers* degenerados desenhados a partir de motivos conservados da região NBS dos genes de resistência. Para o desenho da primeira e segunda combinação de *primers* foi feita uma busca detalhada no NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de todas as seqüências previamente identificadas em trigo como relacionadas com resistência em trigo e com presença do domínio NBS. A identificação e o alinhamento dos motivos p-loop, quinase-2, quinase-3a e GLPL nas 50 seqüências encontradas foram realizados manualmente (Figura 1). A partir deste alinhamento foram desenhados três *primers*, sendo estes a partir dos motivos quinase-1a (p-loop), quinase-2 e GLPL. As combinações do *primer* reverso derivado do motivo GLPL com os *primers* diretos derivados dos motivos p-loop e quinase-2 (Figura 1) foram utilizados para amplificação do DNA genômico do cultivar BR23. A terceira combinação de *primers* foi obtida por YU et al., (1996) a partir do alinhamento dos genes *N* de tabaco e *RPS2* de *Arabidopsis* (Tabela 1). Este par de *primers* foi utilizado para amplificação de DNA genômico e cDNA da cultivar BR23.

PCR, clonagem e seqüenciamento

Para a PCR, o DNA e o cDNA foram diluídos em água ultrapura na proporção de 20 ng/ μ l. Uma solução contendo os seguintes componentes foi preparada: tampão para PCR (Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,8 mM de cada), *primer* direto (250 nM), *primer* reverso (250 nM), *Taq* polimerase (1 U), DNA (60 ng) e água ultrapura até completar um volume de 25 μ l. A combinação de *primers* utilizada encontra-se na Tabela 1. A programação do

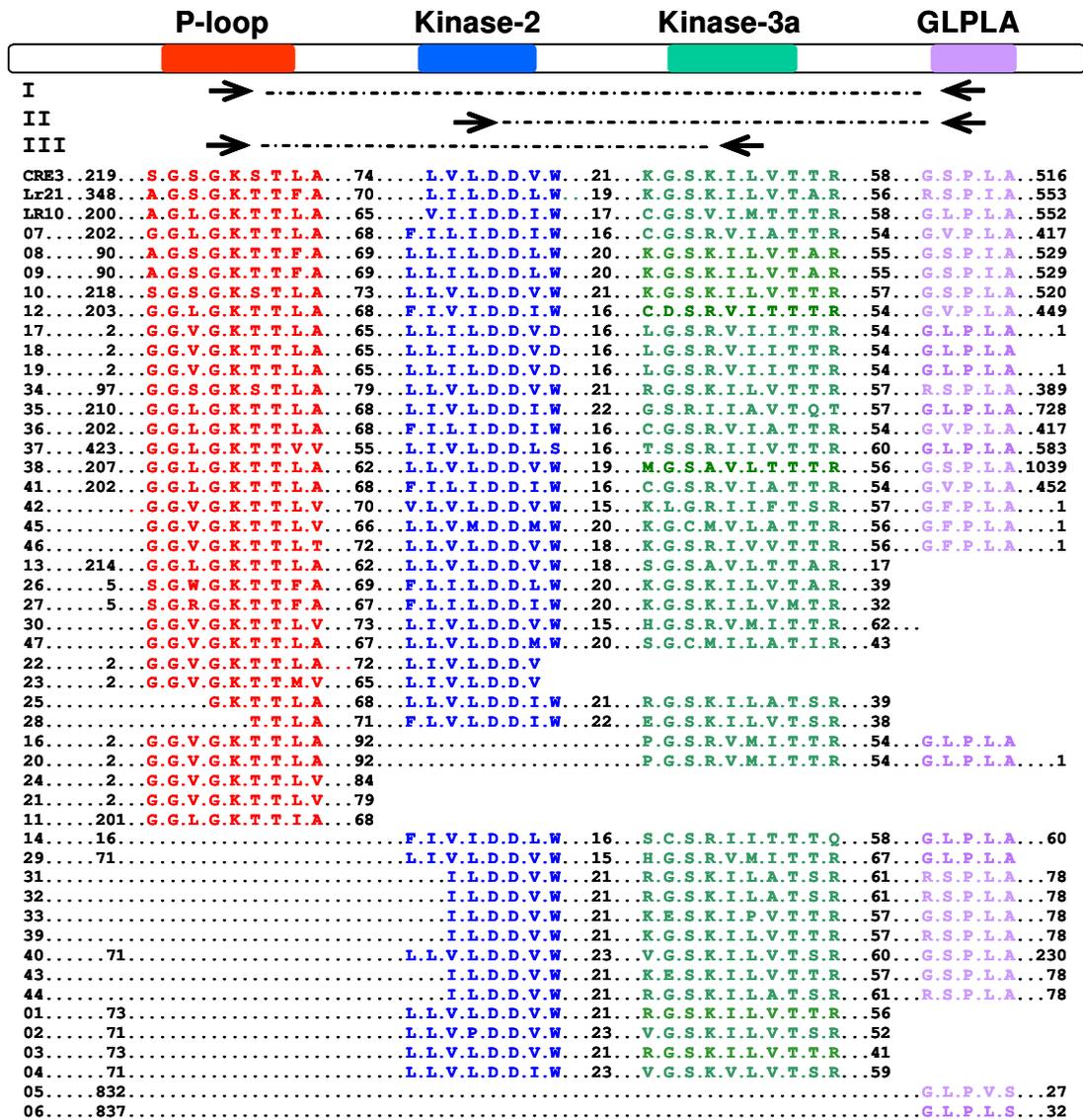


Figura 1- Alinhamento da região NBS de 50 seqüências identificadas no NCBI como sendo de genes de resistência ou RGAs identificados em trigo e espécies afins demonstrando os motivos conservados p-loop, quinase-2, quinase-3a e GLPLA. Os números entre pontos indicam o número de aminoácidos antes, depois e entre os motivos. As setas indicam as regiões amplificadas com as combinações de primers I, II e III que são mostradas à esquerda das setas.

termociclador foi de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55 °C, 2 minutos a 72°C e um passo final de 10 min a 72°C. Após a PCR, a reação foi dividida em duas alíquotas. A primeira foi utilizada para visualização dos

fragmentos em gel de agarose 1,5% (Figura 2) e a segunda alíquota foi utilizada para clonagem. Para clonagem os fragmentos foram ligados no vetor pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen), em seguida, os vetores contendo os fragmentos foram inseridos em células competentes (*E. coli*, linhagem TOP10) por choque térmico. As células foram crescidas por 16 horas em placas contendo meio LB/água com ampicilina. Foram obtidas três mini-bibliotecas, PGT/KGT (composta por seqüências genômicas obtidas com a combinação de *primers* I e II), RGA (composta por seqüências genômicas obtidas com a combinação de *primers* III) e eRGA (composta por seqüências expressas obtidas com a combinação de *primers* III). A caracterização destas mini-bibliotecas de RGAs foi realizada pela PCR utilizando um par de *primers* que flanqueia o sítio de clonagem. Para o seqüenciamento foram selecionados as colônias com fragmentos entre 200 e 500 pb. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando seqüenciador automático (ABI 310, Applied Biosystems).

Tabela 1- *Primers* utilizados para amplificação de RGAs no cultivar de trigo BR23.

Primer	Seqüência degenerada* 5´-3´	Motivo	Combinado com
NBS-F1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	p-loop	NBS-R1
NBS-R1	YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC	quinase-3a	NBS-F1
P-LOOP-F	NSNGGNNBDGGNAARWCNAC	p-loop	GLPLA-R
QUINASE-2-F	HDYNTNNTVTNNHNGATGA	quinase-2	GLPLA-R
GLPLA-R	ABNNNNNHDRHDGCNADDGG	GLPLA	P-LOOP-F e quinase-2-F

* degeneração de acordo com a codificação da IUPAC, R= A/G, Y= T/C, S= G/C, W= T/A, H= T/A/C, B= T/G/C, D= T/A/G, V= A/G/C, N= T/A/G/C

BLAST search, identificação de motivos e análise filogenética

Todos os passos descritos a seguir foram realizados individualmente para cada mini-biblioteca e em seguida com todas juntas. O primeiro passo após a obtenção das seqüências foi a montagem de *contigs* para verificar a presença de seqüências repetidas. Este passo foi realizado utilizando o programa BioEdit 7.0.5.2. Após obtidas as seqüências únicas de cada mini-biblioteca, foi realizado BLASTn contra o banco de nucleotídeos e EST (*est-others*) do NCBI. A identificação de motivos nas seqüências foi realizada utilizando o programa MEME (TIMOTHY & ELKAN, 1994) e visualmente. Para a análise filogenética foram incluídas, juntamente com as seqüências identificadas, 18 seqüências de genes de resistência e RGAs previamente identificadas em trigo, para facilitar a identificação de seqüências com homologia a genes de resistência (Figura 5). Para construção das árvores filogenéticas foi utilizado o método Neighbor-Joining usando a identidade das seqüências geradas pelo alinhamento múltiplo realizado pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994). A formatação das árvores foi realizada pelo aplicativo JalView (CLAMP et al., 2004).

Mapeamento e avaliação do potencial dos RGAs como marcador molecular

Com base nas análises realizadas, 20 (Tabela 3) RGAs foram escolhidos para amplificação em 32 cultivares de trigo (Figura 7) e avaliação da potencialidade como marcador molecular. Para cada um destes RGAs foi desenhado um par de *primers* utilizando o programa *Primer3* (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Os *primers* que apresentaram polimorfismo entre os cultivares BR-35 e IAC-13 foram avaliados na população segregante destes

cruzamentos. Para o mapeamento, todos os pares de *primers* foram avaliados em 18 linhagens nulitetrassômicas da variedade de trigo Chinese Spring.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PCR e construção de mini-bibliotecas

A amplificação de DNA genômico utilizando a combinação de *primers* I e II apresentou um arraste muito forte com fraca definição de banda (Figura 2a), evidenciando uma degeneração muito elevada dos *primers*. Na amplificação de DNA Genômico utilizando a combinação de *primers* III foi observado arraste, no entanto com definição de banda em torno de 250 pb, o que é o tamanho esperado quando utilizados *primers* derivados dos motivos p-loop e quinase-3a (Figura 2b). A amplificação na qual foi utilizada a combinação de *primers* III e cDNA praticamente não apresentou arraste e resultou em uma boa definição de bandas (Figura 2c). A presença de arraste tem sido comum quando utilizado DNA genômico (KANAZIN et al., 1996; LEISTER et al., 1996; YU et al., 1996). Isto se deve à grande quantidade de seqüências que apresentam estes motivos conservados

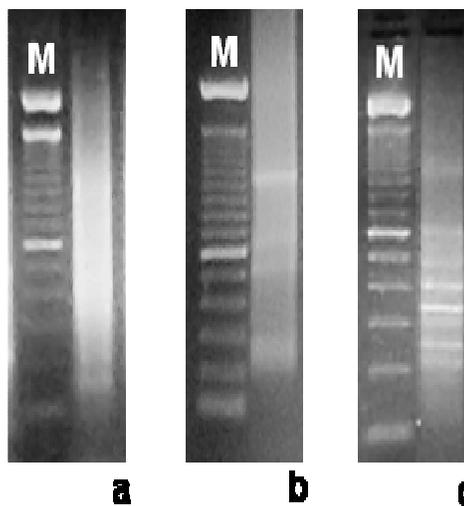


Figura 2 – Padrão de amplificação das combinações de primers degenerados utilizados para amplificação de RGAs na cultivar de trigo BR23. **a)** amplificação de DNA genômico com a combinação de primers I. **b)** Amplificação de DNA genômico com a combinação de primers III. **c)** amplificação de cDNA com a combinação de primers III. M indica o marcador de peso molecular DNA ladder 100pb.

no genoma, no entanto a ordem e distância entre estes motivos encontram-se distribuídas aleatoriamente. Isto é comum em seqüências não codificadoras que se encontram em regiões genômicas onde ocorrem os genes de resistência (MICHELMORE & MEYERS 1998, STEIN et al., 2000; GRAHAM et al., 2002; WEI et al., 2002; YAHIAOUI et al., 2004; KUANG et al., 2004; VALLEJOS et al., 2006). O uso de cDNA permitiu eliminar grande parte deste arraste por amplificar somente a parte expressa das seqüências que apresentam o domínio NBS tornando a amplificação mais seletiva (Figura 2c).

Para cada combinação de *primers* utilizada foi construída uma mini-biblioteca. Com as combinações de *primers* I e II (Figura 1), utilizando DNA genômico da cultivar BR23, foi construída a mini-biblioteca PGT/KGT. Desta mini-biblioteca, foram seqüenciados 20 clones da combinação de *primers* I e 10 clones da combinação II. Após a eliminação de seqüências com baixa qualidade de seqüenciamento e repetidas restaram 15 seqüências da combinação I e 5 da combinação II. A mini-biblioteca RGA, construída com seqüências genômicas amplificadas pela combinação de *primers* III (Figura 1), gerou 65 seqüências. Após a eliminação de seqüências com baixa qualidade de seqüenciamento e repetidas, restaram 27. Com a combinação de *primers* III (Figura 1) e utilizando cDNA do cultivar de trigo BR23 foi construída a mini-biblioteca denominada eRGA. Desta mini-biblioteca foram seqüenciados 96 clones. Após a eliminação de seqüências com baixa qualidade de seqüenciamento e repetidas, restaram 43.

Identificação de motivos

Com a análise de motivos, as seqüências obtidas foram classificadas em sete grupos de acordo com o padrão de motivos presentes (Figura 3). O grupo I foi composto por seqüências com p-loop, quinase-2 e quinase-3a. Neste grupo foram incluídas 12 seqüências, sendo, duas da mini-biblioteca PGT/KGT, sete da mini-biblioteca RGA e três da mini-biblioteca eRGA. O grupo II foi composto por seqüências com p-loop e quinase-3a. Neste grupo foram incluídas 22 seqüências, sendo 10 da mini-biblioteca RGA e 12 da mini-biblioteca eRGA. O grupo III foi composto por seqüências com p-loop e quinase-2. Neste grupo foram agrupados oito seqüências, sendo três da mini-biblioteca RGA e cinco da mini-biblioteca eRGA. O grupo IV foi composto por seqüências somente com p-loop. Neste grupo foram incluídas sete seqüências, sendo duas da mini-biblioteca RGA e cinco da mini-biblioteca eRGA. O grupo V foi composto por seqüências somente com quinase-3a. Neste grupo foram incluídas 12 seqüências, sendo cinco da mini-biblioteca RGA e sete da mini-biblioteca eRGA. Finalmente, o grupo VI foi composto por seqüências com quinase-2 e quinase-3a e seqüências com somente o motivo quinase-2. Neste grupo foram incluídas 18 seqüências, sendo todas da mini-biblioteca PGT/KGT. A

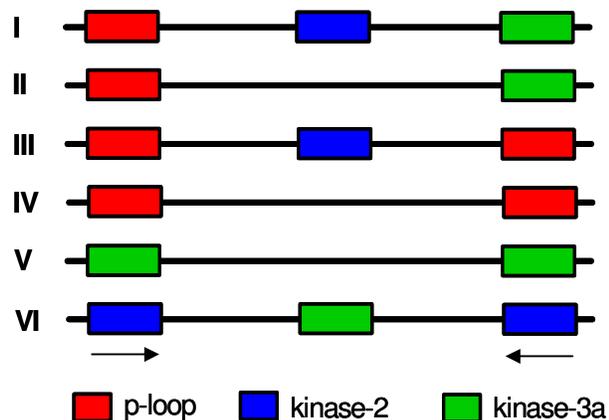


Figura 3 - Grupos formado pelas seqüências de acordo com a presença e ausência dos motivos conservados na região NBS. O número a esquerda indica o grupo. As setas indicam a direção em que o motivo ocorre. A análise dos motivos foi realizada com o auxílio do programa MEME e visualmente.

distribuição em porcentagem das grupos formados de acordo com a presença ou ausência de motivos encontra-se na Figura 4.

A análise dos motivos presentes nas seqüências da mini-biblioteca PGT/KGT mostrou que a maioria destas não apresentava todos os motivos esperados. Todas as seqüências de ambas as combinações de *primers* utilizadas para construir esta mini-biblioteca deveriam apresentar um motivo GLPLA uma

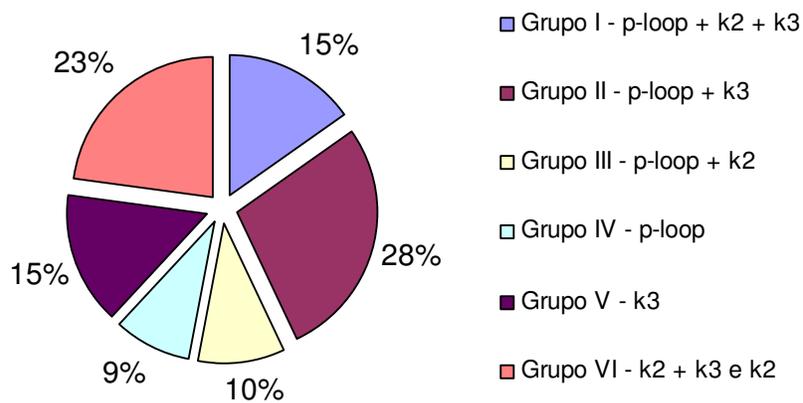


Figura 4 - Distribuição em porcentagem das seqüências obtidas de acordo com a presença ou ausência de motivos conservados. A identificação dos motivos foi realizada pelo programa MEME e visualmente. p-loop = motivo p-loop; k2 = motivo quinase-2 e k3 = motivo quinase-3a.

vez que um dos *primers* utilizados em ambas combinações foi desenhado baseado neste domínio (Figura 1). A ausência deste motivo pode ser explicada pelo fato deste motivo ter sido eliminado durante a formatação das seqüências, uma vez que ele está no final da seqüência onde a qualidade de seqüenciamento geralmente é baixa. No entanto, esta hipótese não é aplicável a todas as seqüências, pois algumas seqüências são pequenas e com boa qualidade de seqüenciamento. A segunda explicação, e mais provável, é que este motivo não é

comum em trigo. DILBIRLIG et al. (2004) clonou e seqüenciou 220 RGAs expressos em trigo e após analisar os motivos nestes RGAS observou que o motivo GLPLA estava presente em um número muito baixo de seqüências. Estes autores concluíram que *primers* degenerados desenhados a partir deste motivo não são eficientes para a amplificação de RGAs em trigo corroborando com os dados aqui obtidos. Todas as seqüências obtidas com a combinação II, com exceção das seqüências PGT2 e PGT10, além de não apresentarem o motivo GLPLA também não apresentaram o motivo p-loop, do qual um dos *primers* foi desenhado. A análise visual destas seqüências revelou a presença de um motivo *myristyl* que apresenta aminoácidos comuns ao motivo p-loop. Desta maneira, este motivo compete com o motivo p-loop e tem vantagem no anelamento do *primer*. Esta amplificação inespecífica ocorreu provavelmente pelo *primer* p-loop possuir um grau elevado de degeneração (Tabela 1). Todas as seqüências obtidas com a combinação de *primers* III (Figura 1) apresentaram, no mínimo, um dos motivos dos quais foram desenhados os *primers*, comprovando a especificidade destes (Figura 3).

Em todas as combinações de *primers* utilizadas (I, II e III) foram observadas seqüências que apresentavam o mesmo motivo em ambas extremidades (Figura 3). Isto ocorre por haverem regiões genômicas onde os sítios de anelamento de um *primer* ocorrem próximos em ambas as fitas do DNA, porém em sentido oposto (Figura 3). Assim, pode ocorrer o anelamento do *primer* nos dois sentidos, promovendo a amplificação. Nas seqüências obtidas com a combinação de *primers* II isto é mais visível, pois a maioria apresentou motivos quinase-2 em ambas extremidades (Figura 3 grupo VI). As regiões contendo

genes de resistência em plantas apresentam uma estrutura de seqüências que facilita este tipo de amplificação. Estas regiões, além de possuírem os genes funcionais, possuem também seqüências altamente similares a genes de resistência, no entanto não funcionais (MICHELMORE & MEYERS 1998, STEIN et al., 2000; GRAHAM et al., 2002; WEI et al., 2002; YAHIAOUI et al., 2004; KUANG et al., 2004; VALLEJOS et al., 2006). Nestas seqüências ocorrem os mesmos motivos conservados encontrados em genes de resistência, no entanto estes nem sempre respeitam a ordem encontrada nos genes de resistência funcionais, devido a recombinações desiguais, inserções de transposons e mutações (DICKINSON, 2003, TROGNITZ & TROGNITZ, 2005). DILBIRLIG et al. (2003), também trabalhando com RGAS em trigo, relatam a ausência de alguns motivos e a ocorrência de motivos em ordem trocada em parte dos RGAs por eles identificados.

BLAST search e identificação de motivos

A comparação das seqüências obtidas por *BLASTn* contra o banco de nucleotídios do NCBI revelou seqüências com partes homologas a transposons tanto nas mini-bibliotecas de DNA genômico quanto de cDNA. Esta observação tem sido comum neste tipo de seqüência, uma vez que os transposons estão em todos os clusters de resistência caracterizados até o momento e intimamente relacionados com a evolução dos genes de resistência (RONALD, 1998; SONG et al., 1998; MICHELMORE & MEYERS 1998, STEIN et al., 2000; GRAHAM et al., 2002; WEI et al., 2002; MEYERS et al., 2003; YAHIAOUI et al., 2004; KUANG et al., 2004; VALLEJOS et al., 2006). Estas seqüências contendo transposons foram

descartadas das próximas análises. O *BLASTn* contra o banco de EST do NCBI permitiu identificar as seqüências com homologia a seqüências previamente identificadas como expressas em trigo (Tabela 2) e em que condição foram isoladas.

Várias seqüências foram identificadas como expressas por *BLASTn* EST em resposta a estresse biótico e mapeadas por *BLASTn* nucleotídeo em BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) contendo genes de resistência previamente identificados (Tabela 2). Muitas destas seqüências que apresentaram homologia com seqüências expressas em resposta a estresse biótico apresentam motivos quinase. Além das proteínas NBS-LRR apresentarem este tipo de motivo, outras proteínas, envolvidas principalmente em sinalização, também os apresentam. As sequências identificadas como expressas em resposta a estresses bióticos que não estão relacionadas diretamente com o reconhecimento de substâncias do patógeno parecem estar envolvidas em outras funções no processo de resistência, dentre elas sinalizações em eventos tardios para potencialização da expressão da resistência (DILBIRLIG et al., 2003).

Tabela 2 – Caracterização estabelecida pela análise no NCBI das seqüências oriundas do cultivar de trigo BR23 amplificadas com *primers* degenerados desenhados a partir de motivos conservados da região NBS de genes de resistência. As linhagens sombreadas indicam as seqüências mapeadas em regiões contendo prováveis genes de resistência e previamente identificadas como expressas em resposta a estresse biótico.

Seqüência	Em Região R	Em estresse	Seqüência	Em Região R	Em estresse
KGT1	+	-	RGA64	-	+
KGT3	+	-	RGA65	+	-
KGT6	-	-	eRGA003	+	+
KGT9	+	+	eRGA006	+	+
PGT1	-	-	eRGA011c	+	+
PGT2	-	-	eRGA015	+	-
PGT9	-	-	eRGA021	+	-
PGT10	-	+	eRGA024	+	+
RGA03	+	-	eRGA029	+	-
RGA05	+	+	eRGA034	+	+
RGA06	+	-	eRGA040	+	-
RGA08	+	+	eRGA042	+	+
RGA11	+	+	eRGA051c	+	-
RGA14	+	+	eRGA052	+	+
RGA23	-	-	eRGA066	+	-
RGA24	-	-	eRGA069	+	-
RGA25	-	+	eRGA076	+	-
RGA30	+	+	eRGA087	+	-
RGA31	+	-	eRGA090	+	-
RGA38	-	-	eRGA109	+	+
RGA39	+	+	eRGA110	+	-
RGA40	+	+	eRGA111	+	+
RGA43	-	-	eRGA112	+	+
RGA44	+	-	eRGA113	+	+
RGA52	+	+	eRGA116	+	+
RGA53	+	+	eRGA117	+	+
RGA55	+	-	eRGA118	+	-
RGA56	+	-	eRGA119	+	+
RGA57	+	-	eRGA120	+	-
RGA59	+	-	eRGA121	+	-

O Agrupamento pelo método Neighbor-Joining dividiu as seqüências em dezesseis grupos (Figura 5). Quinze seqüências foram agrupadas no mesmo grupo dos genes de resistência e RGAs utilizados, indicando grande potencial para serem consideradas RGAs. Destas seqüências, seis foram previamente mapeadas por *BLAST* em BACs contendo genes de resistência. Dentre estas seis, a seqüência eRGA042 apresentou homologia de 92% com um gene NBS-quinase de *Secale montanum* (e-value 0.0, acesso número AF320290) e de 92% com um BAC de trigo onde foram caracterizados os genes *Pst19*, *Lrr19*, *Tak19-1* e *Lrk19* (e-value 2e-169, acesso número AF325196), dentre outras seqüências relacionadas com resistência em outras espécies de plantas.

A análise da seqüência de aminoácidos da seqüência eRGA042 revelou uma ORF (*Open Reading Frame*) de 116 aminoácidos. A realização de *BLASTp* com esta ORF contra o banco de proteínas do NCBI revelou que esta apresenta identidade de 42% com a proteína *RPM1* de *Arabidopsis thaliana* que confere resistência a *Pseudomonas syringae* (e-value 4e-21, número de acesso RPM1_ARATH). Esta identidade foi considerada baixa, uma vez que apresentou 92% de homologia com outras seqüências de resistência quando usada a seqüência de nucleotídeos. No entanto, a realização de *WU-BLAST2* contra o banco de proteínas do EBI (*European Bioinformatics Institute*) revelou que esta ORF possui identidade de 92% com o gene de resistência *Lrr19* de trigo (e-value 8.5e-51, acesso número Q9ATQ8_WHEAT), 85% com o gene *Lrr1* de cevada (e-value 1.5e-45, acesso número Q9SWT8_HORVU), 73% com o gene *Lrr14* de trigo (e-value 2.1e-39, acesso número Q9ATQ3_WHEAT) e com diversas outras seqüências de proteínas de resistência identificadas como expressas de outras

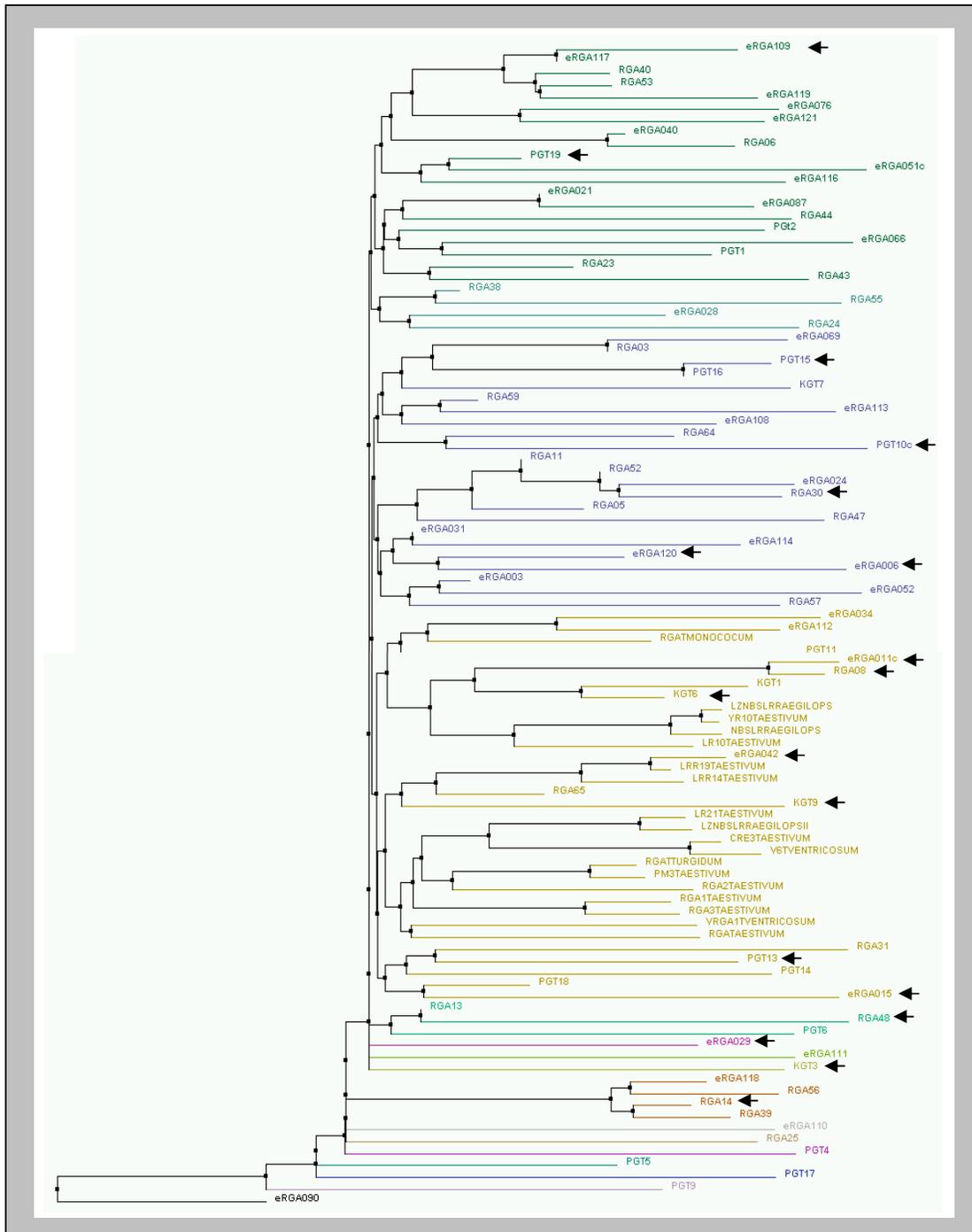


Figura 5 - Árvore filogenética das seqüências identificadas construída pelo método Neighbor-Joining usando a matriz de identidade das seqüências geradas pelo alinhamento múltiplo realizado pelo programa ClustalW. Para facilitar a identificação das seqüências com maior homologia com seqüências de genes de resistência foram utilizadas 18 seqüências previamente identificadas em trigo e espécies afins relacionadas com genes de resistência. As setas indicam as seqüências para as quais foram desenhados primers específicos.

espécies vegetais. O alinhamento parcial entre a ORF da seqüência eRGA42 com a região correspondente dos genes *Lrr19* e *Lrr14* encontra-se na Figura 6. A seqüência KGT9 também apresenta uma ORF de 150 aminoácidos, no entanto o *BLASTp* com esta ORF contra o banco de proteínas do NCBI e do EBI não identificou seqüências com identidade significativa.

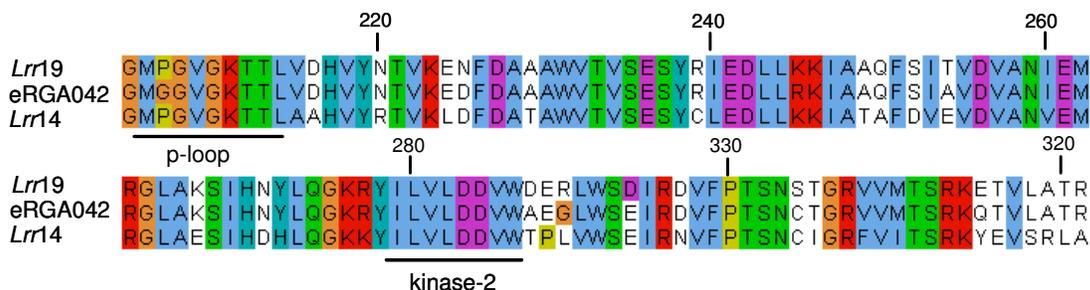


Figura 6 – Alinhamento parcial da seqüência de aminoácidos dos genes *Lrr19*, *Lrr14* e eRGA042. O número acima das seqüências indica a posição do aminoácido baseado na seqüência do gene *Lrr19*. As seqüências sublinhadas indicam os motivos conservados p-loop e quinase-2.

Mapeamento e avaliação do potencial das seqüências identificadas como marcadores moleculares

Dentre as 20 seqüências para as quais foram desenhados *primers* (Figura 5), oito foram mapeadas utilizando linhagens nulitetrassômicas (Tabela 3). Dentre as oito seqüências mapeadas, cinco estão presentes em um único cromossomo e três estão, provavelmente, em mais de um cromossomo (Tabela 3). A presença de múltiplas cópias no genoma tem sido comum com marcadores derivados de genes de resistência. GUIMARÃES et al. (2005) testou doze RGAs derivados do gênero *Arachis* em *Arachis spp* e como resultado observou que todas as seqüências apresentaram mais de uma cópia no genoma. A presença de múltiplas cópias ocorre devido à evolução deste tipo de seqüência estar

intimamente relacionada com duplicações, inserções e deleções mediadas por transposons. Com exceção da seqüência RGA30, que foi mapeada no cromossomo 5A, todas as outras seqüências mapeadas localizaram-se em cromossomos onde já foram mapeados genes de resistência a doenças (Tabela 3). Isto demonstra que essas seqüências tem grande potencial de estarem associadas a algum destes genes de resistência presentes nestes cromossomos.

Tabela 3 - Localização cromossômica dos *primers* derivados das seqüências RGAs e número de genes para resistência a ferrugens mapeados nos respectivos cromossomos. O número entre parênteses indica o número de genes de resistência à ferrugem da folha mapeados no cromossomo.

<i>Primer</i>	Cromossomo	Genes	<i>Primer</i>	Cromossomo	Genes
RGA08	-	-	eRGA113	-	-
RGA14	4A	7 (2)	eRGA120	*	-
RGA30	5A	#	PGT09	-	-
RGA48	2B	22 (4)	PGT10	-	-
eRGA006	3D	3 (2)	PGT13	1A	3 (1)
eRGA029	-	-	PGT15	5B+	3 (1)
eRGA011	-	-	PGT19	-	-
eRGA015	*	-	KGT03	3D+	3 (2)
eRGA042	4D+	4 (1)	KGT06	*	-
eRGA109	-	-	KGT09	*	-

-monomórfico *não apresentou amplificação #nenhum gene mapeado +presente em mais de um cromossomo

Dos 20 *primers* testados em 32 cultivares de trigo, sete apresentaram polimorfismo, tendo potencial para uso como marcador molecular (Tabela 3). Vários trabalhos têm demonstrado a associação de marcadores derivados de RGAs a genes que conferem resistência a doenças (KANAZIN et al., 1996; YU et al., 1996; LEISTER et al., 1996; SPIELMEYER et al., 1998; SHEN et al., 1998; COLLINS et al., 2001; GARCIA-MAS et al., 2001; CORDEIRO & SKINNER, 2002; HUETTEL et al. 2002; BROTMAN et al., 2002; HUETTEL et al., 2002;

RAMALINGAM et al., 2003). Em trigo o primeiro gene de resistência à ferrugem da folha (*Lr21*) foi clonado a partir de um marcador RGA, que em estudos de segregação mostrava-se co-segregando com o gene (HUANG & GILL 2001). Após clonado, comprovou-se que este RGA era parte funcional do gene (HUANG et al., 2003). Em trigo também, dois marcadores derivados de RGAs foram identificados associados a locos de resistência a fusariose (CORTESE et al., 2003; GUO et al., 2006), e outro ao gene *Pm31*, que confere resistência ao míldio

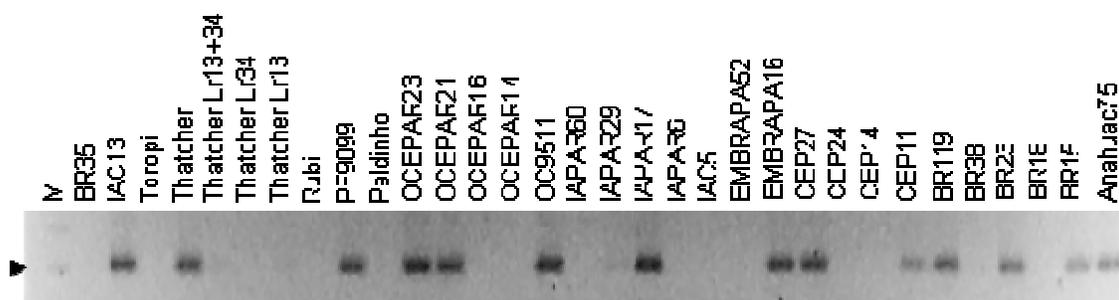


Figura 7 – Padrão de amplificação em 32 cultivares de trigo do primer específico desenhado a partir da seqüência eRGA029. M indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb. A seta à esquerda da Figura indica a posição de 200pb.

(XIE et al., 2004). Em nosso trabalho, os marcadores derivados das seqüências eRGA015 e eRGA029 apresentaram polimorfismo entre os genótipos BR35 e IAC-13. A avaliação destes *primers* na população duplo haplóide deste cruzamento revelou que o *primer* derivado da seqüência eRGA015 está segregando a 21 cM do gene *Lr26*, que confere resistência em fase de plântula à ferrugem da folha e a 28 cM para resistência de planta adulta (Figura 8). A maioria dos *primers* desenvolvidos a partir das seqüências RGAs obtidas apresentou polimorfismo entre outros cultivares contrastantes para genes de resistência à ferrugem da folha. No entanto, não foi possível avaliar a associação destes marcadores com estes genes, pois não há uma população segregante

fenotipada para estes genes. A obtenção de populações segregantes para estes genes permitirá a análise da associação destes marcadores com estes genes.

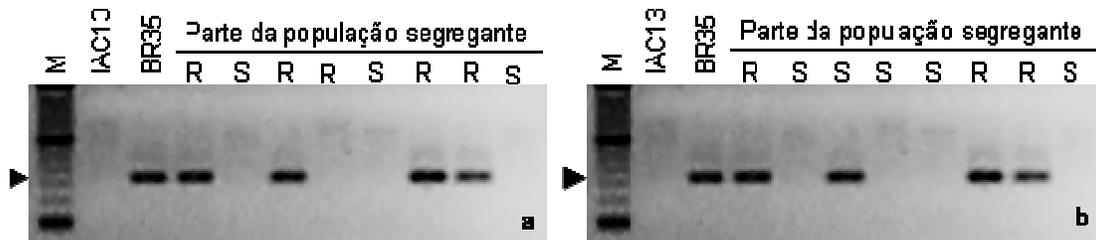


Figura 8 – Padrão de amplificação do marcador derivado da seqüência eRGA015 nos cultivares IAC13 e BR35 e em parte da população duplo-haplóide segregante para resistência a ferrugem da folha derivada do cruzamento entre estes cultivares. **a)** Padrão de resistência (R) e suscetibilidade (S) para resistência de planta adulta. **b)** Padrão de resistência (R) e suscetibilidade (S) em plântula conferida pelo gene *Lr26*. M indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. A seta à esquerda de figura indica a posição de 310 pb.

Até o momento, aproximadamente mil RGAs foram identificados em diversas espécies de plantas com a amplificação de DNA genômico. Esta abordagem tem se demonstrado trabalhosa por amplificar regiões similares a genes de resistência, mas que no entanto não são expressas e não apresentam relação com genes de resistência. Em nosso trabalho utilizamos DNA genômico e cDNA para amplificação de RGAs. A estratégia na qual usamos cDNA gerou seqüências altamente similares a genes de resistência já clonados e marcadores associados à resistência, indicando ser a estratégia mais eficiente, principalmente quando se trabalha com genomas grandes como trigo e aveia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ANIKSTER, Y.; BUSHNELL, W. R.; EILAM, T.; MANISTERSKI, J.; & ROELFS, A.P. *Puccinia recondita* causing leaf rust on cultivated wheats, wild wheats, and rye. **Can. J. Bot.** 75: 2082-2096, 1997.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E. D. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. **Plant Mol. Biol. Rep.**9:211-215, 1991.

- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; & DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, 276:726-733, 1997.
- BARCELLOS, A.L. **Genética de resistência de planta adulta à ferrugem da folha na cultivar brasileira de trigo Toropi (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. Porto Alegre: UFRGS, 1994. 163p. Tese Doutorado.
- BROTMAN, Y.; SILBERSTEIN, L.; KOVALSKI, I.; PERIN, C.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; KLINGLER, J.; THOMPSON, G. A. & PERL-TREVES, R. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance **Theor. Appl. Genet.** 104: 1055-1063, 2002.
- CLAMP, M.; CUFF, J.; SEARLE, S. M. & BARTON, G. J. The Jalview Java Alignment Editor. **Bioinformatics**, 20, 426-427, 2004.
- COLLINS, N. C.; PARK, R.; SPIELMEYER, W.; ELLIS, J. & PRYOR, A. J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. **Genome**, 44: 375–381, 2001.
- CORDEIRO, J. C. & SKINNER, D.Z. Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1283-1289, 2002.
- CORTESE, M. R.; FANELLI, E. & DE GIORGI, C. Characterization of nematode resistance gene analogs in tetraploid wheat. **Plant Science**, 164: 71-75, 2003.
- DICKINSON, M. **Molecular plant pathology**. Bio Scientific Publishers, New York, 2003, 244p.
- DILBIRLIGI, M. & GILL, K. S. Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in wheat. **Plant Mol. Biol.** 53: 771-787, 2003.
- DILBIRLIGI, M.; ERAYMAN, M.; SANDHU, D.; SIDHU, D. & GILL, K. S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. **Genetics**, 166: 461–481, 2004.
- ERAYMAN, M.; SANDHU, D.; SIDHU, D.; DILBIRLIGI, M.; BAENZIGER, S. & GILL, K. S. Demarcating the gene-rich regions of the wheat genome. **Nucl. Acids Res.** 32: 3546-3565, 2004.
- FEUILLET, C.; TRAVELLA, S.; STEIN, N.; ALBAR, L.; NUBLAT, A. & KELLER B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 15253-15258, 2003.
- GARCIA-MAS, J.; VAN LEEUWEN, H.; MONFORT, A.; DE VICENTE, M.C.; PUIGDOMENECH, P. Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon **Plant Science**, 161: 165-172, 2001.
- GRAHAM, M. A.; MAREK, L. F. & SHOEMAKER, R. C. Organization, expression and evolution of a disease resistance gene cluster in soybean **Genetics**, 162: 1961-1977, 2002.
- GUIMARÃES, P. M.; JOSE, A. C. F. V.; PROITE, K.; BERTIOLI, D. J. & LEAL-BERTIOLI, S. C. M. Development of molecular markers for resistance gene analogs in wild *Arachis spp.* **Fitopatol. bras.** [online], 30, 2005.
- GUO P. G.; BAI G. H. & SHANER, G. E. AFLP and STS tagging of major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 106:1011-1017, 2003.
- HAMMOND-KOSACK, K. & JONES, J., Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.** 48: 575-608, 1997.

- HUANG, L.; & GILL, B. S. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilopus tauschii* and wheat. **Theor. Appl. Genet.** 103:1007-1013, 2001.
- HUANG, L.; BROOKS, S. A.; LI, W. L.; FELLERS, J. P.; TRICK, H. N.; GILL, B. S. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploidy genome of bread wheat. **Genetics** 164: 655–664, 2003.
- HUETTEL, B.; SANTRA, D.; MUEHLBAUER, F.J.; KAHL, G. Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. **Theor. Appl. Genet.** 105: 479-490, 2002.
- KANAZIN, V.; MAREK L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 11746-11750, 1996.
- KUANG, H.; WOO, S. S.; MEYERS, B. C.; NEVO, E. & MICHELMORE, R. W. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce **Plant Cell** 16: 2870-2894, 2004.
- LAGUDAH, E. S.; MOULLET, O. & APPELS R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. **Genome** 40: 659-665, 1997.
- LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A. PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nat. Genet.** 14: 421-429, 1996.
- MAGO, R.; NAIR, S.; MOHAN, M. Resistance gene analogs from rice: cloning, sequencing and mapping. **Theor. Appl. Genet.** 99: 50–57 1999.
- MCINTOSH, R. A.; WELLINGS, C. R.; PARK, R. F. **Wheat Rusts: An atlas of resistance genes**, CSIRO Publications, East Melbourne, 1995.
- MEYERS, B. C.; DICKERMAN, A. W.; MICHELMORE, R. W.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; SOBRAL, B. W.; & YOUNG, N. D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Plant J.** 20: 317–332, 1999.
- MEYERS, B. C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H. & MICHELMORE, R. W. Genome-wide analysis of NBS-LRR encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell**, 15: 809-834, 2003.
- MICHELMORE, R. W., & MEYERS, B. C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth and death process. **Genome Res.** 8: 1113–1130, 1998.
- MURRAY, M. & THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.** 8: 4321-4325, 1980.
- PIMENTAL, D.; WILSON, C.; MCCALLUM, C.; HUANG, R.; DWEN, P.; FLACK, J.; TRAN, Q.; SALTMAN, T. & CLIFF, B. Economical and environmental benefits of biodiversity. **BioScience**, 47: 747–757, 1997.
- RAMALINGAM, J.; CRUZ, C. M. V.; KUKREJA, K.; CHITTOOR, J. M.; WU, J. L.; LEE, S. W.; BARAOIDAN, M.; GEORGE, M. L.; COHEN, M. B.; HULBERT, S. H.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Candidate Defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 16: 14-24, 2003.

- ROELFS, A. P.; SINGH, R. P. & SAARI, E. **Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management**. Mexico: CIMMYT. 81 p, 1992.
- RONALD, P. C. Resistance gene evolution. **Curr. Opin. Plant Biol.** 1: 294-298, 1998.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H.J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000.
- SANDHU, D.; SIDHU, D.; GILL, K.S. Identification of expressed sequence markers for a major gene-rich region of wheat chromosome group 1 using RNA Fingerprinting-Differential Display. **Crop Science**, v. 42, p. 1285-1290, 2002.
- SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z. & BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, 274: 765–768, 1996.
- SHEN, K. A.; CHIN, D. B.; ARROYO-GARCIA, R.; OCHOA, O. E.; LAVELLE, D. O.; WROBLEWSKI, T.; MEYERS B.C. & MICHELMORE R. W. *Dm3* is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. **Mol. Plant Microbe Interact.** 15: 251–261, 2002.
- SHEN, K. A.; MEYERS, B. C.; ISLAM-FARIDI, M. N.; CHIN, D. B.; STELLY, D. M. & MICHELMORE, R. W. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. **Mol. Plant Microbe Interact.** 11: 815–823, 1998.
- SONG, W. Y.; PI, L. Y.; BUREAU, T. E., & RONALD, P. C. Identification and characterization of 14 transposon-like elements in the noncoding regions of members of the *Xa21* family of disease resistance genes in rice. **Mol.Gen.Genet.** 258: 449-456, 1998.
- SPIELMEYER, W.; HUANG, L.; BARIANA, H.; LAROCHE, A.; GILL, B. S. & LAGUDAH, E. S. NBS-LRR sequence family is associated with leaf and stripe rust resistance on the end of homoeologous chromosome group 1S of wheat. **Theor. Appl. Genet.** 101: 1139–1144, 2000.
- SPIELMEYER, W.; ROBERTSON, M.; COLLINS, N.; LEISTER, D.; SCHULZE-LEFERT, P.; SEAH, S.; MOULLET, O.; LAGUDAH, E. S. A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*) **GENOME**, 41: 782-788, 1998.
- STEIN, N.; FEUILLET, C.; WICKER, T.; SCHLAGENHAUF, E.; KELLER, B. Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97:13436-13441, 2000.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. CLUSTALW improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-80, 1994.
- TIMOTHY, L. B. & ELKAN, C. "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", Proceedings of the

- Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.
- TROGNITZ, F. C. & TROGNITZ, B. R. Survey of resistance gene analogs in *Solanum caripense*, a relative of potato and tomato, and update on R gene genealogy. **Mol Genet Genomics**. 274: 595-605, 2005.
- VALLEJOS, C. E.; ASTUA-MONGE, G.; JONES, V.; PLYLER, T. R.; SAKIYAMA, N. S. & MACKENZIE, S. A. Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**. 172: 1229-42, 2006.
- WEI, F., R. A. W. & WISE, R. P. Genome dynamics and evolution of the *Mla* (powdery mildew) resistance locus in barley. **Plant Cell**, 14: 1903-1917, 2002.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant. Mol. Biol.** 42:225-249, 2000.
- WENKAI, X.; MINGLIANG, X.; JIUREN, Z.; FENGGE, W.; JIANSHENG, L.; JINGRUI, D. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays L.*). **Theor. Appl. Genet.** 113: 63-72, 2006.
- XIE, C.; SUN, Q.; NI, Z.; YANG, T.; NEVO, E. & FAHIMA, T. Identification of resistance gene analogue markers closely linked to wheat powdery mildew resistance gene *Pm31* **Plant Breeding**, 123:198-200, 2004.
- YAHIAOUI, N.; SRICHUMPA, P.; DUDLER, R. & KELLER, B. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. **Plant Journal**, 37: 528-538, 2004.
- YU, Y. G.; BUSS, G. R.; MAROOF, M. A. S. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93:11751-11756, 1996.
- ZOLDAN, S. M. **Identificação de genes de resistência à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)**. 1998, 83p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade de Passo Fundo, 1998.

CAPÍTULO V

Identificação e caracterização de sequências envolvidas na resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo

Paulo Roberto Da Silva

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul e Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Carla Andréa Delatorre

Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Patussi Brammer

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA-Trigo

Luiz Carlos Federizzi

Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Cristina Kothe Milach

Pioneer Sementes

INTRODUÇÃO

As perdas causadas pela ferrugem da folha nas lavouras tríticolas variam de 10 a 30% anualmente (FAO 2006). O uso de resistência genética é comprovadamente o método mais eficiente e econômico para controle desta doença (MARASAS et al., 2003). A resistência à ferrugem da folha em trigo pode ser específica à raça e não específica à raça. A resistência específica à raça é monogênica, expressa em fase de plântula e tipicamente caracterizada pelo processo de hipersensibilidade. Essa geralmente mantém-se efetiva por um período muito curto pela alta pressão de seleção que exerce sobre o patógeno levar a rápida quebra da resistência (BARCELLOS *et al.*, 1997). A resistência não específica à raça ou de amplo espectro é poligênica (em raros casos monogênica), expressa em fase de planta adulta e na maioria das vezes não apresenta o processo de hipersensibilidade. Esse tipo de resistência não elimina o patógeno completamente como ocorre no processo de hipersensibilidade e sim, interfere na sua taxa de desenvolvimento e reprodução, permitindo a sobrevivência do patógeno, no entanto, mantendo-o em um nível baixo no qual não chega a causar dano significativo à planta. A grande vantagem desse tipo de resistência está no fato dela exercer uma pressão de seleção menos intensa sobre o patógeno e, conseqüentemente, ser capaz de conferir maior durabilidade (JOHNSON, 1984).

Até o momento aproximadamente 50 genes que conferem resistência a doenças em plantas foram clonados (HAMMOND-KOSACK & PARKER, 2003), sendo que a maioria destes confere resistência específica à raça. Os mecanismos de resposta desencadeados nas plantas por estes genes têm sido intensamente

estudados (VERONESE et al., 2003). As interações incompatíveis (resistência) resultam na produção pela planta de uma série de sinalizadores secundários, que incluem espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Estas moléculas sinalizadoras ativam os mecanismos de defesa das plantas, que acabam por eliminar o patógeno. Estes mecanismos incluem reposta por hipersensibilidade, reforço da parede celular e a síntese de substâncias antimicrobianas, como proteínas relacionadas a patogênese (PRPs) e fitoalexinas (VERONESE et al., 2003). Aparentemente a diferença entre a planta resistente e a suscetível está relacionada à rapidez com que esta responde ao ataque de patógenos. Em plantas resistentes, a expressão de genes de defesa é mais rápida e mais intensa do que em plantas suscetíveis (MALECK et al., 2000; MARTINEZ DE ILARDUYA et al., 2003, LI et al., 2006). Interessantemente, muitos genes que são ativados em resposta a estresse biótico também são ativados em resposta a estresse abiótico (GLOMBITZA et al., 2004). Isto sugere que provavelmente a especificidade da resposta está nos primeiros genes ativados durante a interação planta-patógeno.

Os mecanismos moleculares da interação planta-patógeno têm sido extensivamente estudados em arábida, tomate e arroz (MALECK et al., 2000; XIONG et al., 2001; BITTNER-EDDY et al., 2003; MARTINEZ DE ILARDUYA et al., 2003; MATSUMURA et al., 2003; JANTASURIYARAT et al., 2005; LI et al., 2006). Em trigo, KRUGER et al. (2002) analisaram uma biblioteca de EST (*Expressed Sequence Tag*) oriunda de espigas de trigo infectadas com fusarium. Estes autores identificaram 2831 seqüências, incluindo diversas seqüências com homologia a genes previamente relacionados aos mecanismos de resistência a

doenças em outras espécies. No entanto, estes autores não puderam afirmar que estes genes são responsáveis pelos mecanismos de resistência em trigo, pois não utilizaram nenhuma técnica capaz de separar genes de expressão constitutiva da planta e genes induzidos pelo patógeno. LU et al. (2005), analisando os mecanismos de resistência do trigo ao carvão por hibridização subtrativa suprimida (SSH, do inglês *Suppression Subtraction Hybridization*) identificaram 168 seqüências diretamente envolvidas nos mecanismos de resistência. Dentre as seqüências identificadas encontram-se seqüências com alta homologia a genes de resistência, proteínas PRPs, fatores de transcrição, proteínas de transferência de lipídios não-específicas, lipases, etc.

Com exceção destes dois trabalhos em trigo, estes estudos tem sido realizados em plantas diplóides e com resistência específica à raça do tipo monogênica. Pouco se sabe dos mecanismos envolvidos na resistência a doenças em plantas poliplóides e também na resistência poligênica não específica à raça. Em relação à ferrugem da folha do trigo, nenhum trabalho foi publicado relatando os mecanismos de interação. Diante disto, o trabalho aqui desenvolvido teve o objetivo de identificar e caracterizar sequências envolvidas nos mecanismos moleculares da resistência não específica à raça à ferrugem da folha do trigo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal, inoculação e coleta

Para as análises moleculares foram utilizadas linhagens recombinantes F₇ do cruzamento entre o cultivar Toropi (com resistência não específica à raça a

ferrugem da folha) e IAC 13 Lorena (suscetível à ferrugem da folha). Para as inoculações, foram selecionadas as três linhagens mais resistentes e as três linhagens mais suscetíveis deste cruzamento. O uso desta estratégia diminui a possibilidade de identificação de seqüências não relacionadas aos mecanismos de resistência, mas diferencialmente expressas entre os pais (Toropi e IAC 13 Lorena) devido a diferenças fenotípicas existentes entre estes. A inoculação foi realizada com uma mistura de raças suspensas em óleo mineral, em fase de planta adulta. As condições de temperatura e umidade foram controladas a fim de otimizar o estabelecimento da doença. A coleta do material vegetal foi realizada uma hora após a inoculação. Após inoculação e coleta do material vegetal, as plantas foram mantidas em casa de vegetação para confirmação do estabelecimento da doença.

Extração de RNA, síntese de cDNA, construção da biblioteca e seqüenciamento

Para o isolamento do RNA total, o material vegetal foi reunido em dois diferentes grupos. O primeiro constituiu-se do material vegetal oriundo das linhagens resistentes e o segundo do material das linhagens suscetíveis. O RNA total foi isolado separadamente de cada grupo, utilizando-se o sistema “CONCERT™ Plant RNA Reagent” (Invitrogen), de acordo com o protocolo fornecido. O mRNA foi purificado utilizando o sistema de purificação NucleoTrap® mRNA Purification Kit (BD Clontech). A síntese de cDNA foi realizada utilizando “SMART™ cDNA Kits” (BD Clontech).

Para identificação das seqüências diferencialmente expressas, foi empregada a técnica de hibridização subtrativa suprimida (SSH) seguida por PCR (DIATCHENKO et al., 1996; 1998) utilizando a tecnologia "PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit" (BD Clontech). A técnica baseia-se na hibridização das amostras *tester*, neste caso cDNA derivado das planta resistentes, com as amostras *driver*, representadas pelo cDNA oriundo das plantas suscetíveis. Ao final dos ciclos de hibridização, são amplificados somente fragmentos presentes na amostra *tester* que não têm contrapartida no *pool* de fragmentos da amostra *driver*. Após realizada a SSH, os fragmentos foram clonados utilizando o "Topo TA Cloning Kit" (Invitrogen). Os fragmentos foram ligados no vetor pCR "2.1-TOPO" (Invitrogen) e inseridos em células competentes (*E. coli*, linhagem XL1) por choque térmico. A biblioteca de cDNA foi constituída de aproximadamente 800 clones, dos quais 200 foram selecionados aleatoriamente para seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando seqüenciador automático (ABI 310, Applied Biosystems).

Análise *in silico* das seqüências

A formatação das seqüências e a montagem de *contigs* foi realizada utilizando o programa BioEdit 7.0. A predição da função das seqüências foi determinada pela comparação nos bancos de dados NCBI (National Center Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/services>), utilizando *Blast search* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990). Para classificação funcional das seqüências foram utilizadas ferramentas disponíveis no KEGG,

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) e *Prosite* (<http://www.expasy.org/prosite/>). Para mapeamento *in silico* foi utilizada a base de dados de EST mapeadas do NCBI e do GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).

RT-PCR semi-quantitativo

Para confirmação da expressão diferencial foram escolhidas 25 seqüências e analisadas por RT-PCR semi-quantitativo. Para cada seqüência foi desenhado um par de primers específico utilizando o programa *Primer3* (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Estes primers foram utilizados para amplificação utilizando o cDNA derivado das plantas resistentes e suscetíveis. O cDNA de ambas as amostras foi quantificado independentemente quatro vezes em espectrofotômetro a fim de determinar a quantidade exata de cDNA em cada amostra. Para as reações de RT-PCR foi utilizado o seguinte protocolo: tampão para PCR (Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,8 mM), primer direto (10 µM), primer reverso (10 µM), Taq DNA polimerase (1 U), 66 ng de cDNA e água ultrapura para completar um volume total de 60 µl. As reações foram levadas ao termociclador no qual a programação consistia de um passo inicial de 4 min a 94 °C seguidos de 23 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a uma temperatura que variava de acordo com o primer utilizado e 30 seg a 72 °C. Após 26 ciclos foi retirada uma alíquota de 10 µl e assim sucessivamente de três em três ciclos até 35 ciclos. As amostras foram resolvidas em gel de agarose 1,5% e visualizadas por coloração com brometo de etídio. As imagens foram digitalizadas através do "Electrophoresis Documentation and Analysis System" (EDAS, Kodak Digital

Science[®]). Para determinar a localização destas seqüências nos cromossomos do trigo via PCR foram utilizadas 18 linhagens nuli-tetrassômicas do cultivar Chinese Spring cedidas pelo Dr. John Flintham, do John Innes Centre, Norwich, Reino Unido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção e caracterização da biblioteca de resistência à ferrugem da folha

A observação do desenvolvimento da doença nas plantas mantidas em casa-de-vegetação, após a inoculação e coleta de material, confirmou a eficácia da inoculação. Após formatação, das 200 seqüências enviadas para seqüenciamento, 70 apresentaram boa qualidade. Com a montagem de contigs, foram obtidas 59 seqüências únicas (Tabela 1). As seqüências TRS061, TRS058 e TRS059 apresentaram cinco, quatro e três cópias, respectivamente, e as seqüências TRS054 e TRS060 duas cópias cada. Todas as outras seqüências foram únicas na biblioteca.

Caracterização funcional

A comparação por *BLAST* indicou que 69% das seqüências obtidas apresentam homologia com genes depositados em bancos de dados com função conhecida (Tabela 1). Estas seqüências foram classificadas em 11 classes funcionais (Figura 1, Tabela 1). A maior classe, com 19% das seqüências, foi a que agrupou os genes codificadores de enzimas relacionadas aos processos de síntese e processamento de proteínas. A potencialização da maquinaria de síntese protéica é essencial para a síntese de proteínas e enzimas envolvidas nos

mecanismos secundários da resistência. Para a síntese de proteínas são necessários aminoácidos e energia. Doze por cento das seqüências identificadas estão envolvidas na produção de energia e 9% no metabolismo de aminoácidos (Figura 1, Tabela 1). Outra importante classe funcional foi a envolvida na transdução de sinais, transportadores e comunicação celular que representou 10% das seqüências identificadas (Figura 1, Tabela 1). As outras classes obtidas foram: metabolismo secundário (7%), regulação transcricional (5%), óxido redutases (3%), citoesqueleto (3%) e proteína de resistência (2%) (Figura 1, Tabela 1). Das seqüências restantes, 28% apresentaram homologia com seqüências previamente identificadas como expressas em trigo, no entanto sem função conhecida e, 3% não apresentaram homologia significativa nos bancos de dados (Figura 1, Tabela 1). A seguir será discutido o potencial papel das principais seqüências de cada classe funcional identificada no processo de resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo e a interrelação entre estas classes funcionais.

Tabela 1 - Anotação das seqüências diferencialmente expressas identificadas em resposta a resistência não específica à raça à ferrugem da folha no cultivar de trigo Toropi. ^a Homologia identificada no NCBI, ^b homologia identificada no EBI. ^{1, 2, 3, 4} Homologia com seqüências caracterizadas de trigo, arroz, arabidopsis e cevada, respectivamente. ⁵ Mapeado no GrainGenes, ⁶ no NCBI e ⁷ com nulitetrassômicos. ^{8,9 e 10} Cromossomo de trigo, arroz e cevada, respectivamente.

Clone	Homologia	Nº acesso	E-value	Cromoss.
Metabolismo Secundário				
TRS008	Squalene monooxygenase ^{a,1}	Ta.7591	8e-75	
TRS017	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase ^{a,1}	Ta.10120	1e-117	2 ^{6,9}
TRS046	putative s-adenosylmethionine synthetase ^{a,1}	Ta.2752	3e-165	2AS 2BS 2DS 5DS ^{5,8}
TRS048	S-adenosylmethionine decarboxylase, putative ^{a,1}	Ta.1058	3e-149	3DL ^{5,8}

Tabela 1 (continuação)

Transdução de sinal, Transportadores e Comunicação Celular				
TRS005	Calmodulin binding ^{a,1}	Ta.28363	3e-102	
TRS026	Chitin elicitor binding protein ^{b,2}	Q1ESX3_ORYSA	1.2e-15	
TRS003	Tetraspannin ^{a,1}	Ta.34736	2e-89	
TRS028	phosphate/triose-phosphate translocator precursor ^{a,1}	Ta.27728	2e-51	1 ^{6,9}
TRS045	integral membrane protein, putative ^{a,1}	Ta.1040	0.0	
TRS033	Nucleoporin p62 homolog protein ^{b,2}	Q64075_9	3.1e-05	
Síntese, Processamento e Degradação de Proteínas				
TRS009	30S ribosomal protein S5 ^{a,1}	Ta.10162	6e-79	
TRS014	Proteasome subunit alpha type 5-1 ^{a,1}	Ta.11971	2e-17	
TRS025	dnaJ protein Ribosomal protein ^{a,1}	Ta.25124	1e-104	1AL 1BL 1DL ^{5,8}
TRS036	putative pseudouridine synthase ^{a,1}	Ta.38633	2e-153	
TRS040	thioredoxin h (<i>T. aestivum</i>)	Ta.31601	9e-88	
TRS006	Translation elongation factor 1 alpha-subunit ^{a,1}	Ta.659	1e-113	2DL ^{6,8}
TRS024	prenyl-dependent CAAX protease ^{a,1}	Ta.36622	1e-133	
TRS037	ATCPISCA; structural molecule ^{a,1}	Ta.22684	7e-94	
TRS004	ATP-dependent helicase ^{a,1}	Ta.26274	5e-69	5B ^{7,8}
TRS034	Chaperone protein dnaJ-related-like ^{b,2}	Q6EPX0_ORYSA	1.9e-16	
TRS052	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding ^{a,1}	Ta.16397	2e-81	
Citoesqueleto				
TRS053	tubulin alpha-6 chain ^{a,1}	Ta.24248	0.0	7AL 7BL 7DL2AL 2BL 2DL 6AS 6BS 6DS 5DL 1AL ^{5,8}
TRS056	Actine ^{a,1}	Ta.1139	6e-53	
Regulação Transcricional				
TRS029	putative zinc finger POZ domain protein ^{a,1}	Ta.32044	0.0	
TRS058	NAC domain-containing protein ^{a,1}	Ta.9136	0.0	7DS ^{5,8}
TRS059	leucine zipper-containing protein	Ta.28257	0.0	
Metabolismo Primário/Energia				
TRS031	cytosolic triosephosphatisomerase ^{a,1}	Ta.27753	0.0	2AS 2BS 2DS 3BS 3DS ^{5,8}
TRS038	acetyl-CoA synthetase ^{a,1}	Ta.7578	2e-150	
TRS042	putative component of cytochrome B6-F complex ^{a,1}	Ta.861	1e-145	5DL ^{6,8}
TRS049	photosystem II type I chlorophyll a b binding protein ^{a,1}	Ta.22984	1e-76	2B ^{7,8}
TRS061	ribulose-bisphosphate carboxylase small unit ^{a,1}	Ta.27923	2e-157	2AS 2BS 2DS 5DS ^{5,8} 3BL ^{6,8}

Tabela 1 (continuação)

TRS007	Transaldolase ^{a,1}	Ta.9372	1e-78	
TRS020	NADP-specific isocitrate dehydrogenase ^{a,2}	Os.12610	6e-85	
Metabolismo de Aminoácidos				
TRS032	alanine-glyoxylate aminotransferase ^{a,1}	Ta.568	6e-94	3H ^{6,10}
TRS050	anthranilate synthase alpha subunit ^{a,1}	Ta.45924	8e-131	
TRS057	sulfate adenyltransferase ^{a,1}	Ta.47512	7e-60	4 ^{6,9}
TRS002	Glycine hydroxymethyltransferase ^{a,1}	Ta.27135	2e-81	3 ^{6,9}
TRS023	Fumarylacetoacetate hydrolase ^{a,1}	Ta.29359	8e-106	
Oxiredutases				
TRS044	ferredoxin-NADP+ reductase ^{a,1}	Ta.1167	6e-157	
TRS021	aldo-keto reductase/ oxidoreductase ^{a,1}	Ta.12015	4e-148	
Proteína de Resistência				
TRS001	Resistance protein ^{a,1}	Ta.26046	4e-73	5BL, 5DL ^{5,8}
Expressa com função desconhecida				
TRS010	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.3295	4e-95	
TRS015	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.47925	2e-115	
TRS016	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.120	3e-111	
TRS018	Expressed sequence ^{a,1}	CD866321	3e-171	
TRS019	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.45007	1e-39	1 ^{6,9}
TRS022	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.25544	4e-117	
TRS027	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.38946	1e-52	
TRS030	Expressed sequence ^{a,1}	CA689404	3e-35	
TRS035	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.14072	5e-07	
TRS041	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.12382	5e-85	
TRS043	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.7722	2e-66	
TRS047	Expressed sequence ^{a,1}	CA729369	2e-51	
TRS051	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.5131	8e-125	
TRS054	Expressed sequence ^{a,4}	Hv.19583	2e-79	
TRS055	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.19185	4e-19	
TRS060	Expressed sequence ^{a,1}	Ta.9750	6e-85	
Sem homologia significativa				
TRS011	No hits			
TRS012	No hits			

Sinalizadores primários da presença do patógeno, possíveis genes de resistência

A percepção da presença do patógeno pela planta desempenha um papel fundamental no processo de resistência (MONTESANO et al., 2003). Para os genes que conferem resistência por hipersensibilidade específica à raça a teoria mais difundida, e com exemplos já comprovados, é que há uma interação direta

entre o produto do gene de avirulência (Avr) do patógeno com o produto do gene de resistência da planta (R), culminando na expressão da resistência (BELKHADIR et al., 2004). Na resistência não específica à raça não se sabe como ocorrem estes eventos primários de sinalização.

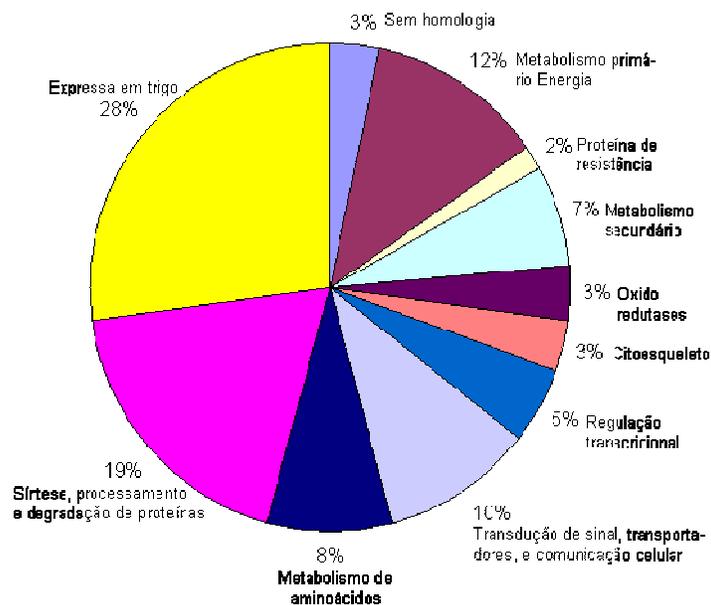


Figura 1 – Caracterização funcional das seqüências identificadas como diferencialmente expressas em resposta a resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo.

Provavelmente há também a interação de elicitores do patógeno com receptores nas plantas, no entanto diferentes dos produtos dos genes Avr. Estes elicitores são classificados como gerais (KAKU et al., 2006), podendo ser proteínas secretadas e fragmentos da parede celular do fungo ou produtos da própria planta originados pela degradação provocada pelo fungo. As plantas capazes de reconhecer estes tipos de elicitores parecem ter uma resistência mais ampla, pois este tipo de elicitor não é específico a uma única raça (MONTESANO et al., 2003). Em nosso trabalho identificamos três seqüências que apresentam domínios trans-membrana, candidatas a sinalizadores primários da presença do patógeno. A seqüência TRS026 apresentou homologia com um gene que codifica uma proteína de ligação a elicitor de quitina (Tabela 1). KAKU et al. (2006), caracterizando as proteínas de ligação a elicitor de quitina, observaram que estas

proteínas fazem parte de um complexo sinalizador presente na membrana da célula e é capaz de interagir com uma série de proteínas do citoplasma das células. A seqüência TRS003 apresentou homologia a uma *tetraspanin* (Tabela 1). A *tetraspanin* é uma proteína de membrana que, em humanos, é componente essencial de uma rede envolvida na sinalização do sistema imunológico (LEVY & SHOHAM, 2005). Em plantas pouco se sabe sobre as *tetraspanin*, mas parecem estar diretamente relacionadas à transdução de sinal do meio externo para o citoplasma da célula (BALUSKA et al., 2003). Tanto as proteínas de ligação a elicitores de quitina quanto as *tetraspanin* são capazes de interagir com uma série de outras proteínas, dentre elas importantes sinalizadores secundários como proteínas G e proteínas quinase (LEVY & SHOHAM, 2005; BALUSKA et al., 2003). Em plantas, as proteínas G e quinases estão diretamente associadas com a transdução de sinais gerados pelos genes de resistência para o desencadeamento do processo de resistência (DICKISON, 2003). Desta forma, as seqüências TRS0026 e TRS003 parecem desempenhar um papel fundamental na percepção do fungo causador da ferrugem no trigo e na sinalização através de proteínas G e quinase para desencadeamento dos mecanismos de resistência. A seqüência TRS045 também apresentou homologia a uma proteína integral de membrana, porém sem função conhecida. Interessantemente, o gene *mlo*, que confere resistência ao míldio, semelhante à resistência à ferrugem da folha conferida pelos genes presentes no cultivar Toropi, também é uma proteína integral de membrana (BUSCHGES et al., 1997). Estes dados sugerem que estas seqüências aqui identificadas, com homologia a proteínas integrais de membrana,

podem estar desempenhando funções semelhantes à do gene *mlo* de cevada, neste caso para resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo.

Além destas três seqüências, que parecem estar diretamente associadas ao reconhecimento do patógeno e serem fortes candidatas a compor parte dos genes de resistência, a seqüência TRS001 apresentou homologia com uma seqüência identificada em arroz com domínios NBS-LRR característicos de genes de resistência. Desta maneira, esta seqüência também deve ter um papel importante na resistência.

Sinalizadores secundários, amplificação de sinais para ativação de resistência sistêmica adquirida

Na resistência específica à raça (hipersensibilidade), em dicotiledôneas, logo após o reconhecimento do patógeno pelos genes de resistência ocorre aumento das concentrações citosólicas de ácido salicílico (AS) e explosão oxidativa. O aumento das concentrações de AS, no citosol, promove a dissociação da proteína NPR1 a monômeros que migram para o núcleo da célula, levando à indução da resistência sistêmica adquirida (RSA) (DESPRES et al., 2003). Em monocotiledôneas, mesmo não ocorrendo alterações nas concentrações de AS, ocorre a ativação da RSA via NPR1 (KOGEL et al., 2005). Estudos realizados em cevada, comparando a resistência específica à raça e não específica à raça, demonstraram que na resistência não específica à raça, além de não haver mudanças nas concentrações de AS, também parece não haver estresse oxidativo em nível tão elevado, pois as enzimas características de resposta ao estresse oxidativo não apresentaram diferenças no padrão de

expressão em plantas com genes de resistência raça-não-específico (HEIN et al., 2004). Desta forma, acreditamos que em monocotiledôneas, na resistência não específica à raça, a sinalização para desencadear os mecanismos de resistência não depende de alto estresse oxidativo e nem de mudança nas concentrações de AS, como ocorre na resistência por hipersensibilidade e em dicotiledôneas. Provavelmente, sinalizadores secundários capazes de perceber sensíveis mudanças no potencial redoxi da célula, ou mesmo outros tipos de mudanças ocorridas pela presença do patógeno, devem desempenhar este papel neste tipo de resistência. A seqüência TRS005, identificada em nosso trabalho, pode estar desempenhando esta função em trigo. Esta seqüência apresentou homologia a uma proteína que se liga a calmodulina (Tabela 1). As calmodulinas são proteínas que se ligam a cálcio e desempenham importante papel na sinalização. O cálcio é um dos sinalizadores mais importantes da célula. A mudança nas concentrações citosólicas de cálcio está diretamente relacionada com a ativação de diversos genes envolvidos no metabolismo e nos mecanismos de resposta a estresses nas plantas (SANDERS et al., 2002). Desta maneira, esta seqüência pode estar relacionada à sinalização para desencadeamento dos mecanismos de resistência modulada pela mudança nas concentrações citosólicas de cálcio.

Alguns genes de resistência dependem da interação com outros genes para serem funcionais. Um exemplo é o gene *Mla6* que confere resistência específica à raça ao míldio em cevada. Este gene necessita de dois outros genes (*Rar1* e *Sgt1*) para ser funcional. O gene *Rar1* codifica uma proteína de ligação a zinco que contém domínios conservados de cisteína e histidina (SHIRASU et al., 1999). O gene *Sgt1* codifica uma subunidade do complexo SCF ubiquitina ligase

(AZEVEDO et al., 2002). A resistência mediada pelo gene *Mla6* depende da interação destas proteínas e formação de um complexo que pode estar envolvido na marcação de proteínas para maturação ou degradação via ubiquitinação (AZEVEDO et al., 2002). Homólogos destes dois genes desempenham a mesma função em arabidopsis, neste caso para resistência a bacteriose conferida pelo gene *RPS2* (TAKAHASHI et al., 2003). O gene *mlo*, que confere resistência não específica à raça a míldio em cevada, também depende de outros dois genes (*Ror1* e *Ror2*) para ser funcional (FREIALDENHOVEN et al., 1996). A seqüência TRS052, identificada neste trabalho, apresentou homologia com um gene que codifica uma proteína ubiquitina ligase que se liga ao íon zinco e a outras proteínas. A seqüência TRS052 apresenta as estruturas características dos genes *Rar1* e *Sgt*, podendo assim estar envolvida na resistência a ferrugem da folha pela interação com os genes de resistência presentes em Toropi.

O gene *NPR1* é essencial para o desencadeamento da RSA via indução da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (ZHANG et al 1999). Este processo se dá pela ligação, no núcleo da célula, da proteína codificada pelo gene *NPR1* a uma classe de fatores de transcrição denominados TGA, que contém um zíper de leucina. Esta interação é capaz de regular a ligação ao DNA, controlando assim a síntese de PRP1, que é um marcador de RSA (DESPRES, et al., 2003). A seqüência TRS029 apresentou homologia a uma seqüência que codifica uma proteína contendo o domínio *zinc finger POZ*, motivo este característico das proteínas NPR1 (Tabela 1). A seqüência TRS059 apresentou homologia a uma seqüência que codifica uma proteína contendo um zíper de leucina. Este domínio é característico dos fatores de transcrição TGA, no qual se

liga a proteína NPR1, para ativação da RSA. Estes dados sugerem que as seqüências TRS029 e TRS059 possam ser homólogas aos genes NPR1 e TGA encontrados em dicotiledôneas, podendo assim, estar desempenhando o papel de sinalizadores secundários envolvidos no desencadeamento da resistência sistêmica adquirida em trigo, porém não dependentes de AS e estresse oxidativo como ocorre em dicotiledôneas.

A seqüência TRS058 apresentou homologia com um gene que codifica uma proteína contendo um motivo NAC. Em plantas estes motivos são característicos de uma família de fatores de transcrição que estão relacionados principalmente ao desenvolvimento. Porém, estudos recentes têm observado que alguns genes desta família são rapidamente induzidos na presença de patógenos (OH et al 2003; HEGEDUS et al., 2003). A seqüência TRS058 foi a que apresentou o segundo maior número de cópias na biblioteca, desta forma esta seqüência deve exercer uma função importante no controle da transcrição de genes envolvidos na resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo.

Ativação de rotas envolvidas na expressão de resistência sistêmica adquirida

A sinalização gerada nas células pela presença do patógeno tem a função de ativar a síntese de substâncias de defesa que irão combater o patógeno e evitar que outras infecções ocorram (DURRANT & DONG, 2004). Para a síntese destas substâncias são necessárias mudanças consideráveis no metabolismo da célula. Estudos recentes têm demonstrado que, em plantas resistentes, a expressão de genes de defesa é mais rápida e mais intensa do que em plantas

suscetíveis (MALECK et al., 2000; MARTINEZ DE ILARDUYA et al., 2003, LI et al., 2006). Apesar de não terem sido identificadas seqüências codificadoras de PRPs, foram identificados mensageiros secundários envolvidos na ativação destas (*NPR1* e *TGA*). Isto pode se dever ao tempo decorrido da inoculação a coleta das amostras. Em *arabidopsis* e cacau o acúmulo de PRPs ocorre somente três horas após a inoculação (LORENZO et al., 2003; VERICA et al., 2004).

Os produtos do metabolismo secundário são considerados não essenciais para as plantas, pois na ausência destes e não havendo condições adversas a planta pode sobreviver normalmente (HARALAMPIDIS et al., 2001). No entanto, quando a planta é submetida a algum estresse, rapidamente esta ativa o metabolismo secundário a fim de produzir substâncias capazes de auxiliar na defesa. Para a ativação da síntese destas substâncias é necessário energia e precursores que são produzidos no metabolismo primário. A identificação neste trabalho de proteínas diretamente ligadas a potencialização da fotossíntese e do ciclo de Calvin (metabolismo primário/energia e oxido-redutases, Tabela 1) indica que a célula está investindo na produção primária de energia e esqueletos de carbono, os quais poderão ser utilizados na síntese de substâncias do metabolismo secundário necessárias para combater o patógeno. A identificação de seqüências com homologia a genes codificadores de transportadores de triose-fosfato (TRS028) e de enzimas do ciclo das pentoses, envolvidas na conversão de triose fosfato em eritrose (TRS031 e TRS007), sugere que a planta esta utilizando a triose-fosfato, oriunda do ciclo de Calvin, para a produção de eritrose. Isto é esperado uma vez que a eritrose, além de ser precursora de aminoácidos, é também precursora de ligninas e polifenóis que desempenham um

papel importante na resistência. A lignina está relacionada com o reforço da parede celular para impedir novas infecções e para que o patógeno já estabelecido não se desenvolva para células vizinhas (KANG & BUCHENAUER, 2002). Os polifenóis, além de poderosos anti-oxidantes, também desempenham um papel fundamental na resistência, por serem precursores de diversas substâncias antimicrobianas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992; GOGOI et al., 2001).

As seqüências TRS046 e TRS048 apresentaram homologia com os genes que codificam as enzimas s-adenosil-metionina sintase e s-adenosil-metionina descarboxilase, respectivamente. A s-adenosil-metionina sintase sintetiza o s-adenosil-metionina (SAM), que é precursor de etileno e de poliaminas (espermina e espermidina) (EVEN-CHEN et al., 1982). A síntese de poliaminas a partir de SAM é controlada pela enzima s-adenosil-metionina descarboxilase. Ambas substâncias têm papel na resistência a doenças. O etileno está envolvido na sinalização para desencadear RSA e as poliaminas são substâncias antimicrobianas (GUO & ECKER 2004; WALTERS, 2003).

Os metabólitos secundários derivados da rota dos isoprenóides têm um papel fundamental nos mecanismos de resistência das plantas. Dentre estes metabólitos estão as fitoalexinas e saponinas, que são importantes antimicrobianos vegetais. As plantas vasculares possuem duas rotas de síntese de isoprenóides, uma nos cloroplastos e outra no citosol (WENTZINGER et al., 2002). Identificamos em nosso trabalho quatro enzimas envolvidas na rota de síntese de isoprenóides. A seqüência TRS038 apresentou homologia com o gene que codifica a acetil CoA sintase. O acetil CoA é o substrato utilizado pra iniciar a

rota dos isoprenóides no citosol (WENTZINGER et al., 2002). A seqüência TRS0017 apresentou homologia com o gene que codifica o gene 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintase. A enzima codificada por este gene é uma das responsáveis pelo controle da conversão de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato em farnesil difosfato no ciclo dos isoprenóides presentes nos cloroplastos (ROHMER, 1999). A ação de enzimas específicas direcionam o farnesil difosfato para diferentes rotas, que produzirão substâncias distintas como terpenos (mono, di, tri e sesquiterpenos), esteróides, poliesteróides, grupos prenil e proteínas preniladas (NEWMAN & CHAPPELL, 1999). A seqüência TRS008 apresentou homologia com o gene que codifica a esqualeno monooxigenase. Esta enzima catalisa a primeira reação da rota que transforma o esqualeno, derivado do farnesil difosfato, em esteróide (WENTZINGER et al., 2002). A seqüência TRS024 apresentou homologia com um gene que codifica uma protease dependente de prenil. Estas proteases são responsáveis pela regulação pós transcricional das proteínas preniladas produzidas na rota dos isoprenóides (BRACHA et al., 2002).

Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR semi-quantitativo

Dentre as 25 seqüências utilizadas para análise da confirmação de expressão diferencial, 17 confirmaram os resultados obtidos pela SSH (Figura 2). As oito seqüências restantes não apresentaram amplificação. Esta ausência de amplificação pode ser pelo baixo número de cópias de mRNA destes genes, ou mesmo por baixa qualidade do primers. Dentre as seqüências candidatas a serem correspondentes a genes de resistência e sinalizadores iniciais para desencadear o processo de resistência, as seqüências TRS001, TRS005, TRS029, TRS045 e TRS059 foram testadas por RT-PCR semi-quantitativo. Com exceção da

seqüência TRS001, que não apresentou amplificação, todas mostraram diferenças no nível de expressão entre plantas resistentes e suscetíveis (Figura 2). As seqüências TRS029 e TRS045, que são fortes candidatas a serem os genes de resistência, só apresentaram amplificação nas plantas resistentes após 36 ciclos de PCR (Figura 2). Os genes de resistência são de expressão constitutiva e estão em um número muito baixo de cópias nas células, o que dificulta a visualização por técnicas baseadas em PCR (DILBIRLIG et al., 2003). Entre as três seqüências identificadas associadas a rotas de metabolismo de compostos secundários e analisadas por RT-PCR, as seqüências TRS017 e TRS048 apresentaram amplificação somente nas plantas resistentes, mostrando que uma hora após a inoculação a expressão destes genes foi específica nas plantas resistentes. A seqüência TRS008 não apresentou amplificação. Dentre as 17 seqüências avaliadas relacionadas com o metabolismo basal da célula, cinco não apresentaram amplificação, as 12 restantes confirmaram serem diferencialmente expressas nas plantas resistentes.

A resistência não específica à raça à ferrugem da folha no cultivar Toropi é conferida por dois genes localizados nos cromossomos 1AS e 4DS (DA-SILVA 2002). O mapeamento *in silico* e com nulitetrassômicos permitiu estabelecer a localização genômica de 16 seqüências das 25 analisadas (Tabela 1). Nenhuma das seqüências mapeadas é candidata a ser correspondente a genes de resistência à ferrugem da folha no cultivar Toropi. Além destas seqüências não estarem localizadas nos cromossomos onde foram mapeados os genes de Toropi, estas são homólogas a genes envolvidos no metabolismo basal das células (Tabela 1).

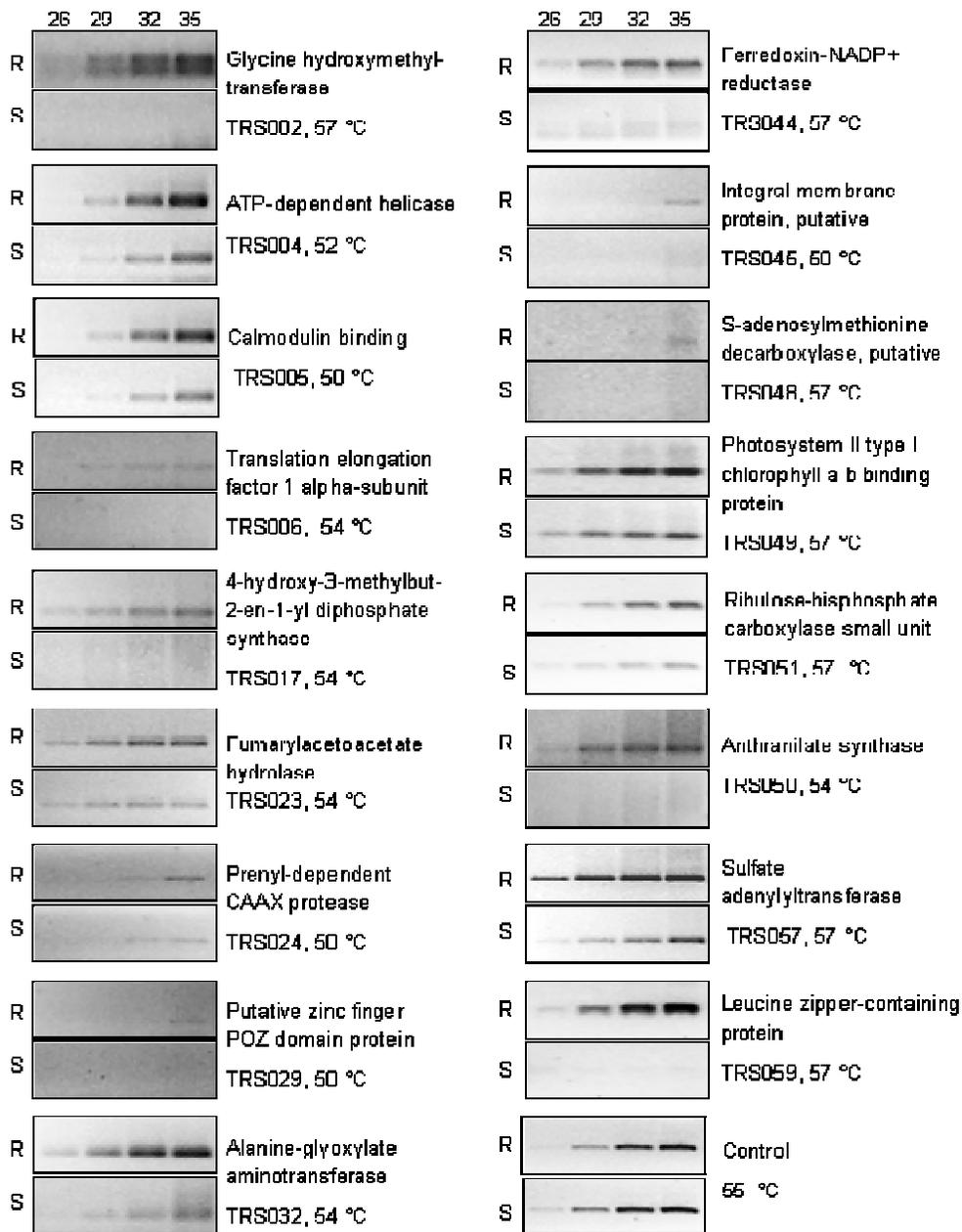


Figura 2 – Confirmação por RT-PCR semi-quantitativo de parte das seqüências identificadas pela SSH como diferencialmente expressas em resposta à resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo. A amplificação foi realizada utilizando como molde cDNA de plantas resistentes (R) e suscetíveis (S) coletado uma hora após inoculação com o fungo causador da ferrugem da folha. O número no topo da Figura indica o número de ciclos no qual foi retirada a amostra. Após o nome do provável gene encontra-se a codificação da seqüência e a temperatura de pareamento dos primers utilizada para amplificação. Como controle foi utilizado um par de *primers* desenvolvido por BOFF (2006), que amplifica o gene codificador de um transportador de malato.

Este é o primeiro trabalho realizado para identificação de genes envolvidos na resistência não específica à raça à ferrugem da folha em trigo e também o primeiro realizado para identificação de genes induzidos imediatamente após o contato da planta com o patógeno (uma hora após a inoculação). Os resultados aqui encontrados demonstram que: 1) aparentemente na resistência não específica à raça a percepção do patógeno pela planta ocorre imediatamente após a fixação do esporo; 2) o primeiro passo da planta ao reconhecer a presença do patógeno é a alteração de seu metabolismo basal para produção de precursores para o metabolismo secundário; 3) possivelmente ocorre sinalização para desencadeamento de RSA (Resistência Sistêmica Adquirida) mediada por *NPR1* e *TGA*, no entanto, possivelmente não dependente de ácido salicílico; 5) aparentemente não ocorre explosão oxidativa e conseqüentemente, não há morte celular, o que não gera reação de hipersensibilidade; 3) há uma rápida indução de rotas envolvidas na síntese de substâncias antimicrobianas.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência não específica à raça e, conseqüentemente, identificação de genes chave neste processo, abre a possibilidade do desenvolvimento de cultivares de trigo com amplo espectro de resistência, pela engenharia genética, que poderá vir a contribuir para a sustentabilidade da triticultura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410, 1990.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E. D. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. **Plant Mol. Biol. Rep.**9:211-215, 1991.
- AZEVEDO, C.; SADANANDOM, A.; KITAGAWA, K.; FREIALDENHOVEN, A.; SHIRASU, K. & SCHULZE-LEFERT, P. The *RAR1* interactor *SGT1*, an

- essential component of R gene-triggered disease resistance. **Science**, 295: 2073–2076, 2002.
- BALUSKA, F.; SAMAJ, J.; WOJTASZEK P.; VOLKMANN, D. & MENZEL. D. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. **Plant Physiol.** 133: 482-491, 2003.
- BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. & ROELFS, A. P. Ferrugem da folha do trigo (*Puccinia recondita*): durabilidade da resistência. **Summa Phytopathol.** 23: 101-111, 1997.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R. & DANGL, J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Curr Opin Plant Biol** 7: 391–399, 2004.
- BITTNER-EDDY, P.; ALLEN, R. L.; REHMANY, A. P.; BIRCH, P. & BEYNON, J. L. Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant Pathol.** 4: 501-507, 2003.
- BOFF, T. Tolerância ao alumínio em trigo: **Identificação e Caracterização Molecular de Genes**. 2006, 184 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação e Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
- BRACHA, K.; LAVY, M. & YALOVSKY S. The *Arabidopsis* AtSTE24 Is a CAAAX Protease with Broad Substrate Specificity. **J. Biol. Chem.** 277: 29856–29864, 2002.
- BUSCHGES, R.; HOLLRICHER, K.; PANSTRUGA, R.; SIMONS, G.; WOLTER, M.; FRIJTERS, A.; VAN DAELEN, R.; VAN DER LEE, T.; DIERGAARDE, P.; GROENENDIJK, J.; TOPSCH, S.; VOS, P.; SALAMINI, F. & SCHULZE-LEFERT, P. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen Resistance. **Cell**, 88: 695-705, 1997.
- DA-SILVA, P. R. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 2002, 64 p. Dissertação da Mestrado. Programa de Pós-Graduação e Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.
- DESPRES, C.; CHUBAK, C.; ROCHON, A.; CLARK, R.; BETHUNE, T. DESVEAUX, D. & FOBERT, P. R. The *Arabidopsis NPR1* disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. **Plant Cell**, 15: 22181–2191, 2003.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F. C.; CAMPBELL, P. A. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 6025-6030, 1996.
- DIATCHENKO, L.; LUKYANOV, S.; LAU, Y. F. C. et al. Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. **Methods Enzymol.** 303: 349-380, 1998.
- DICKINSON, M. **Molecular plant pathology**. Bio Scientific Publishers, New York, 2003, 244p.
- DILBIRLIGI, M. & GILL, K. S. Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in wheat. **Plant Mol. Biol.** 53: 771-787, 2003.

- DILBIRLIGI, M.; ERAYMAN, M.; SANDHU, D.; SIDHU, D. & GILL, K. S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. **Genetics**, 166: 461–481, 2004.
- DURRANT, W. E. & DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42: 185–209, 2004.
- EVEN-CHEN, Z.; MATTOO, A. K. & GOREN R. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from 3,4-[14C]methionine into spermidine in aged orange peel disc. **Plant Physiol.** 69: 385–388, 1982.
- FAO, UN Food and Agriculture Organization (www.fao.org), 2006.
- FREIALDENHOVEN, A.; PETERHANSEL, C.; KURTH, J.; KREUZALER, F. & SCHULZE-LEFERT, P. Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. **Plant Cell**, 8: 5–14, 1996.
- GLOMBITZA, S.; DUBUIS, P. H.; THULKE, O.; WELZL, G.; BOVET, L.; GÖTZ, M.; AFFENZELLER, M.; GEIST, B.; HEHN, A.; ASNAGHI, C.; ERNST, D.; SEIDLITZ, H. K.; MARTINOIA, E.; WERCK-REICHHART, D. D.; MAUCH, F. & SCHÄFFNER A. R. Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. **Plant. Mol. Biol.** 54: 1-19, 2004.
- GOGOI, R.; SINGH, D. V. & SRIVASTAVA, K. D. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. **Plant Pathol.** 50: 470-476, 2001.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. & PARKER, J. E. Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Curr. Opin. Biotechnol.** 14, 177–193, 2003.
- HARALAMPIDIS, K.; TROJANOWSKA, M. & OSBOURN, A. E. Biosynthesis of thriterpenoid saponins in plants. **Adv. Biochem. Eng. Biothechnol.** 75:31-49, 2001.
- HEGEDUS, D.; YU, M.; BALDWIN, D.; GRUBER, M.; SHARPE, A.; PARKIN, I.; WHITWILL, S. & LYDIATE, D. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. **Plant Mol. Biol.** 53: 383-397, 2003.
- HEIN, I.; CAMPBELL, E. I.; WOODHEAD, M.; HEDLEY, P. E.; YOUNG, V.; MORRIS, W.L.; RAMSAY, L.; STOCKHAUS, J.; LYON, G. D.; NEWTON, A.C. & BIRCH, P. R. Characterisation of early transcriptional changes involving multiple signalling pathways in the *Mla13* barley interaction with powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). **Planta** 218: 803-813, 2004.
- JANTASURIYARAT, C.; GOWDA, M.; HALLER, K.; HATFIELD, J.; LU, G.; STAHLBERG, E.; ZHOU, B.; LI, H.; KIM, H.; YU, Y.; DEAN, R. A.; WING, R. A.; SODERLUND, C. & WANG, G. L. Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. **Plant Physiol.** 138: 105 – 115, 2005.
- JOHNSON, R. A. Critical analysis of durable resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 22: 309-330, 1984.
- KAKU, H.; NISHIZAWA, Y.; ISHII-MINAMI, N.; AKIMOTO-TOMIYAMA, C.; DOHMAE, N.; TAKIO, K.; MINAMI, E. & SHIBUYA, N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103: 11086-11091, 2006.

- KANG, Z. & BUCHENAUER, H. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 57:255-268, 2000.
- KOGEL, K. H. & LANGEN, G. Induced disease resistance and gene expression in cereals. **Cell. Microbiol.** 7: 1555–1564, 2005.
- KRUGER, W. M.; PRITSCH, C.; CHAO, S. & MUEHLBAUER, G. J. Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 15: 445-455, 2002.
- LEVY S. & SHOHAM, T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. **Nat. Rev. Immunol.** 5: 136–148, 2005.
- LI, C.; BAI, Y.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.; LINDHOUT, P. & BONNEMA, G. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. **Plant. Mol. Biol.** 62:127-140, 2006.
- LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. & SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, 15: 165-178, 2003.
- LU, Z. X.; GAUDET, D. A.; FRICK, M.; PUCHALSKI, B.; GENSWEIN, B., & LAROCHE, A. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. **J. Biochem. Mol. Biol.** 38: 420-431, 2005.
- MALECK, K.; LEVINE A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K. A.; DANGL, J. L. & DIETRICH, R. A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nat. Genet.** 26: 403-410, 2000.
- MARASAS, C. N.; SMALE, M. & SINGH, R. P. Marasas CN et al. (2003) The economic impact of productivity maintenance research: breeding for leaf rust resistance in modern wheat. **Agric. Econ.** 29:253-263.
- MARTINEZ DE ILARDUYA, O.; XIE, Q. & KALOSHIAN, I. Aphid induced defense responses in Mi-1 mediated compatible and incompatible tomato interactions. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 16: 699-708, 2003.
- MATSUMURA, H.; REICH, S.; ITO, A.; SAITOH, H.; KAMOUN, S.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D. H. & TERAUCHI, R. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 15718–15723, 2003.
- MONTESANO, M.; BRADER, G. & PALVA, E. T. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathol.** 4: 73-79, 2003.
- NEWMAN, J. D. & CHAPPELL, J. Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning Within the Cytoplasmic Pathway. **Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.** 34: 95–106, 1999.
- NICHOLSON, R. L. & HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30: 369-389, 1992.
- OH, S. K.; LEE, S.; YU, S. H. & CHOI, D. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. **Planta**, 222: 876-87, 2005.

- ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Nat. Prod. Rep.** 16: 565–574, 1999.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H.J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000.
- SANDERS, D.; PELLOUX, JÉRÔME.; BROWNLEE, C. & HARPER, J. F. Calcium at the crossroads of signaling. **The Plant Cell** 14, 401-417. 2002.
- SANDHU, D.; SIDHU, D.; GILL, K.S. Identification of expressed sequence markers for a major gene-rich region of wheat chromosome group 1 using RNA Fingerprinting-Differential Display. **Crop Sci.** v. 42, p. 1285-1290, 2002.
- SANMIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z. & BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, 274: 765–768, 1996.
- SHIRASU, K.; LAHAYE, T.; MAN-WAH, T.; ZHOU, F.; AZEVEDO, C. & SCHULZE-LEFERT, P. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. **Cell**, 99: 355–366, 1999.
- TAKAHASHI, A. A.; CASAIS, C.; ICHIMURA, K. & SHIRASU, K. *HSP90* interacts with *RAR1* and **SGT1** and is essential for *RPS2*-mediated disease resistance in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 11777–11782, 2003.
- VERICA, J.; MAXIMOVA, S.; STREM, M.; CARLSON, J.; BAILEY, B.; & GUILTINAN, M. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Rep.** 23: 404–413, 2004.
- VERONESE, P.; RUIZ, M. T.; COCA, M. A.; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; LEE, H.; IBEAS, J. I.; DAMSZ, B.; PARDO, J. M.; HASEGAWA:M.; BRESSAN, R. A.; NARASIMHAN, M. L. Defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant. Physiol.** 131: 1580-1590, 2003.
- WALTERS, D.; COWLEY, T. & MITCHELL, A. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. **J. Exp. Bot.** 53: 747–756, 2002.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant. Mol. Biol.** 42:225–249, 2000.
- WENTZINGER, L. F.; BACH, T. J. & HARTMANN, M. A. Inhibition of Squalene Synthase and Squalene Epoxidase in Tobacco cells triggers an up-regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. **Plant Physiol.** 130: 334–346, 2002.
- XIONG, L.; LEE, M. W.; QI, M. & YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14: 685–692, 2001.
- ZHANG, Y.; FAN, W.; KINKEMA, M.; LI, X. & DONG, X. Interaction of *NPR1* with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96: 6523-6528, 1999.

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO GERAL

A ferrugem da folha é a doença de maior importância econômica na triticultura mundial. Esforços têm sido feitos pelo melhoramento genético para superar o patógeno e garantir a sustentabilidade da triticultura. Tradicionalmente os programas de melhoramento têm introduzido resistência específica à raça nos cultivares. Atualmente, a melhor estratégia para manter uma proteção efetiva contra a ferrugem da folha consiste na combinação de genes independente do tipo de resistência que estes conferem. Esta combinação via melhoramento clássico tem sido difícil, uma vez que a presença de um gene mascara o efeito do outro. O uso de marcadores moleculares pode superar esta dificuldade, pois permite ao melhorista selecionar com base no genótipo da planta.

Nos trabalhos desenvolvidos neste projeto, utilizamos diferentes estratégias para disponibilizar marcadores para os diferentes tipos de resistência existentes. A primeira estratégia consistiu na validação de marcadores PCR-específicos, disponíveis na literatura, associados a genes *Lr* de interesse no Brasil (Capítulo II). Dos cinco marcadores avaliados, quatro mostraram ter grande potencial de uso na seleção assistida para genótipos brasileiros, pois mostraram-se coerentes, amplificando somente em plantas com a presença do gene em questão. A identificação de marcadores previamente identificados como associados a genes *Lr*, que em nosso trabalho não apresentaram especificidade aos cultivares contendo estes genes, demonstram a necessidade da realização

de trabalhos de validação antes da utilização destes marcadores na seleção assistida.

Além da validação de marcadores já desenvolvidos, também identificamos novas seqüências associadas a outros genes importantes que conferem resistência à ferrugem da folha. A estratégia utilizada foi baseada no tipo de resistência conferida por esses genes e também na possível estrutura molecular destes genes. Para a resistência específica à raça, monogênica, que na maioria das vezes é conferida por genes com domínios conservados, utilizamos *primers* degenerados (Capítulo IV). Esta estratégia se mostrou altamente eficiente, principalmente quando combinada com a amplificação de cDNA. Com esta estratégia identificamos seqüências com alta homologia a genes de resistência já caracterizados, podendo assim serem partes funcionais destes genes. O uso destas seqüências poderá permitir a clonagem destes genes. O uso de *primers* baseados nestas seqüências permitiu a identificação de marcadores associados à resistência à ferrugem da folha. A identificação de somente um marcador associado à resistência foi devido a termos somente dois genótipos com populações segregantes fenotipadas. A observação de que a maioria dos *primers* desenvolvidos identificou alto polimorfismo evidencia que estes *primers* podem estar associados a outros genes de resistência, passíveis de serem identificados em populações segregantes específicas para os mesmos.

Para identificação de marcadores moleculares potencialmente associados aos genes de resistência não específica à raça, que aparentemente não apresentam domínios NBS, utilizamos a combinação da técnica de AFLP com linhagens diferenciais contrastantes para os genes de interesse (Capítulo III).

Apesar de termos encontrado dificuldades na transferência do polimorfismo dos marcadores AFLP para os marcadores SCARs, foi possível identificar três seqüências potencialmente associadas ao gene *Lr34*. A avaliação destes marcadores em uma população segregante fenotipada para este gene permitirá a comprovação desta associação.

Outro passo importante na obtenção de plantas com resistência durável é a identificação e caracterização de novos genes que conferem resistência não específica à raça. O cultivar brasileiro de trigo Toropi apresenta resistência não específica à raça à ferrugem da folha. A resistência deste cultivar tem atraído a atenção dos melhoristas, pois tem se mantida durável por mais de 40 anos. Esforços têm sido realizados pelo nosso grupo para a identificação de marcadores associados a estes genes. Além de já termos obtido marcadores AFLP associados a estes genes, e um destes já ter sido convertido em marcador SCAR, o uso deste marcador na seleção assistida é limitado, pois encontra-se a 27 cM do gene. Esta dificuldade em identificar marcadores próximos a estes genes pode ser devido à complexa organização genômica do trigo e principalmente por estes genes estarem localizados em regiões cromossômicas pobres em marcadores. Desta maneira, optamos, neste trabalho, por identificar e caracterizar genes envolvidos nos processos iniciais dos mecanismos moleculares de resistência neste cultivar (Capítulo V). Construimos uma biblioteca enriquecida com genes induzidos pelo fungo causador da ferrugem da folha. Esta estratégia foi utilizada por ser conhecido que a especificidade da resposta a diferentes estresses em plantas está nos momentos iniciais da percepção destes. Analisando seqüências imediatamente após a percepção do patógeno pela

planta, poderíamos identificar genes chave responsáveis pelo desencadeamento do processo de resistência não específica à raça à ferrugem da folha em Toropi. A análise da biblioteca obtida permitiu a identificação de quatro seqüências com potencial papel no reconhecimento primário do patógeno. Estas seqüências apresentaram homologia a genes que codificam proteínas trans-membrana que apresentam função de transdução do sinal de meio externo para o meio interno da célula, sendo assim fortes candidatas em serem partes dos genes de resistência presentes em Toropi. Estas seqüências, identificadas como responsáveis pela sinalização primária da presença do patógeno, podem ter uma aplicação direta no melhoramento genético, seja para o desenvolvimento de marcadores funcionais para uso na seleção assistida ou mesmo para o uso destas na engenharia genética. Além das seqüências com homologia com sinalizadores primários, também identificamos seqüências com homologia a sinalizadores secundários envolvidos nos processo de resistência. Dentre estas, estão seqüências com homologia a genes codificadores de fatores de transcrição com conhecida função na resistência, e também a genes codificadores de proteínas cuja presença tem sido relatada como essencial para a funcionalidade de alguns genes de resistência. Além destas seqüências potencialmente associadas ao reconhecimento do patógeno e transdução de sinais, identificamos também seqüência com homologia a genes codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo primário e na produção de energia. Isto é esperado, uma vez que a planta necessita de energia e precursores para poder aumentar seu metabolismo secundário e produção de substâncias que irão combater o patógeno. Não identificamos nenhuma seqüência com homologia a genes

codificadores de PRPs ou outras substâncias microbianas, no entanto identificamos várias seqüências com homologia a enzimas envolvidas em passos iniciais das rotas de síntese destas substâncias. Isto indica que a planta está ainda em processo de ativação das rotas necessárias para a produção de substâncias que irão combater o fungo. A maioria dos trabalhos de expressão diferencial iniciam a coleta de material quatro horas após a inoculação, com isso a maioria dos genes identificados são genes relacionados com resposta a estresses em geral. A identificação em nosso trabalho de seqüências iniciais das rotas específicas para resposta a doenças está relacionada à estratégia que utilizamos, de coletar material imediatamente após a inoculação.

A resistência à ferrugem da folha em trigo apresenta formas diferenciadas de expressão. Cada tipo de resistência parece ser derivada de genes com diferentes estruturas e mecanismos de ação. A piramidização destes genes e, conseqüentemente, destes diferentes mecanismos de resistência em um cultivar poderá conferir a este a resistência ampla e durável almejada no melhoramento. Os marcadores validados, as seqüências obtidas e o mecanismo de resistência parcialmente elucidado neste trabalho representam um passo importante para a obtenção deste cultivar.