

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO
ENTRE *Magnaporthe grisea* E ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Caren Regina Cavichioli Lamb
Bióloga, MSc./UFRGS

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2006

Dedico

Aos meus pais, Sergio e Marinez, minha eterna gratidão pela vida, amor, apoio, dedicação e pela educação que me proporcionaram.

À minha irmã, Fabiana, pelas palavras de carinho, incentivo e amizade.

À minha irmã, Ana Paula, pelo convívio nos últimos anos do curso, apoio, compreensão e amizade.

Ao meu esposo, Flávio, pelo seu amor, companheirismo e acima de tudo compreensão nesses anos de distância e ausência.

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Ao professor Marcelo Gravina de Moraes pela orientação, confiança, amizade e dedicação dispensadas durante estes anos. O meu muito obrigada!!!

Ao pesquisador João Leodato Nunes Maciel pelo apoio prestado.

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) pela disponibilidade das dependências para o desenvolvimento do estudo.

À amiga e laboratorista do IRGA, Catiane dos Santos, pela dedicação e atenção dispensadas durante os experimentos desenvolvidos no IRGA.

Aos colegas e amigos, Adriana, Alex, Elisangela, Flávia Vanina, Jeferson, Johannes, Marcos Vinícios, Mônica, Paula, Ricardo e Sandra pelo convívio.

Aos amigos, Alex, Flávia Vanina, Johannes, Marcos Vinícios e Paulo com quem pude compartilhar momentos difíceis, de incertezas e de alegrias. Jamais esquecerei de vocês...

Aos bolsistas de Iniciação Científica, Álvaro, Paulo, Johannes e Jeferson, pelo auxílio prestado.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, pela amizade e colaboração.

À secretária do programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello.

À amiga Sônia Maria Lobato Schuch pelo apoio e carinho recebidos.

Aos amigos do Departamento de Plantas de Lavoura, Tatiana e Paulo.

À minha vó Tereza, pelo apoio, presença e exemplo de vida.

Ao meu sogro e a minha sogra, Silvino e Ivone, pelo apoio, amor e compreensão dispensados durante esses anos.

Aos amigos Luiza, Rogério e Júnior, que mesmo longe, sempre estiveram presentes e torceram por mim.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE *Magnaporthe grisea* E ARROZ (*Oryza sativa* L.)¹

Autor: Caren Regina Cavichioli Lamb
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

A brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, é uma das mais importantes doenças da cultura do arroz. A resistência genética é a forma mais efetiva para o controle da doença. Os objetivos do presente trabalho foram: identificar genes envolvidos na resposta de resistência à infecção de *M. grisea* em arroz através das técnicas de expressão diferencial; obter e caracterizar uma biblioteca de cDNAs utilizando como modelo linhas quase-isogênicas de arroz (NILs = Near Isogenic Lines), contendo os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-2*; e avaliar e comparar a expressão diferencial de mRNAs, através dos cDNAs isolados em uma série de cultivares com resposta distinta à infecção de *M. grisea*. Foram identificados dois isolados com virulência diferencial para as NILs e um isolado para os cultivares. Os cDNAs relacionados à resistência do arroz à *M. grisea* foram identificados a partir de mRNAs isolados das NILs. Foram obtidos 30 fragmentos de cDNAs e 232 clones de cDNAs pelas técnicas de cDNA-AFLP e SSH, respectivamente. A análise das seqüências permitiu identificar genes envolvidos nos processos de metabolismo, transporte de íon inorgânico; transdução de sinais; fatores de transcrição; metabolismo de coenzima; conversão e produção de energia; metabolismo e transporte de carboidrato e biossíntese de proteína. Noventa clones isolados através da técnica de SSH foram selecionados e a expressão diferencial foi avaliada via hibridização em macroarranjos de cDNAs. A ausência de conservação entre os mRNAs diferencialmente expressos nas interações analisadas e a diversidade dos grupos de genes reflete a complexidade das respostas. A análise funcional *in vivo* desses genes poderá contribuir para utilização dos mesmos na obtenção de uma resistência de espectro amplo à brusone do arroz.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (143 p.) Março, 2006.

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN INTERACTIONS BETWEEN RICE (*Oryza sativa* L.) AND *Magnaporthe grisea*¹

Author: Caren Regina Cavichioli Lamb

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Rice blast, caused by the fungus *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, is one of the most important rice diseases. The genetic resistance is the most effective strategy to control the disease. The objectives of the present work were: to identify genes involved in the resistance response to *M. grisea* infection through differential expression techniques; to obtain and to characterize a cDNAs library based on near-isogenic lines (NILs) of rice, carrying the *Pi-1* and *Pi-2* resistance genes; and to evaluate and to compare the differential expression of mRNAs by the isolation of cDNAs in a group of cultivars with distinct response to *M. grisea*. Two isolates with distinct virulence to NILs and one isolate with distinct virulence to the cultivars were identified. cDNAs related to *M. grisea* resistance were identified from mRNAs isolated from the NILs. Thirty fragments of cDNAs and 232 clones have been obtained by cDNA-AFLP and SSH, respectively. Sequence analysis has allowed the identification of genes involved in the metabolism processes, inorganic ion transport, signals transduction, transcription, coenzyme metabolism, conversion and production of energy, metabolism and transport of carbohydrates, and protein biosynthesis. Ninety clones isolated through the SSH technique have been selected to evaluate the differential expression by cDNAs macroarray analysis. The lack of conservation among mRNAs differentially expressed in the interactions and the diversity of the groups of genes reflects the complexity of the responses. Functional analysis *in vivo* of these genes will contribute to develop a broad-spectrum resistance to the rice blast.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (143 p.) March, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I.....	4
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. O arroz.....	4
2.1.1. Principais doenças da cultura do arroz.....	6
2.1.2. Genômica estrutural	7
2.2. A brusone do arroz	9
2.2.1. Etiologia.....	11
2.2.2. Sintomatologia.....	13
2.2.3. Ciclo da doença.....	14
2.2.4. Controle da brusone do arroz.....	16
2.3. Genes de resistência à brusone do arroz	17
2.4. Mecanismos moleculares envolvidos na interação entre <i>M. grisea</i> e arroz	19
2.4.1. Fatores de reconhecimento.....	19
2.4.2. Transdução de sinais	23
2.4.3. Respostas de defesa.....	28
2.5. Técnicas de análise de expressão gênica diferencial.....	30
CAPÍTULO II.....	38
3. Avaliação da resistência de linhas quase isogênicas e genótipos de arroz a isolados de <i>Magnaporthe grisea</i>	38
3.1. Introdução.....	38
3.2. Materiais e Métodos	41
3.2.1. Material vegetal e isolados de <i>M. grisea</i>	41
3.2.2. Inoculação e coleta do material	42
3.2.3. Teste de resistência	44
3.3. Resultados e Discussão	45
3.3.1. Análise da resistência.....	45
CAPÍTULO III.....	49
4. Identificação e caracterização de genes envolvidos na interação entre <i>Magnaporthe grisea</i> e arroz através da técnica de cDNA-AFLP	49
4.1. Introdução.....	49

4.2. Materiais e Métodos	53
4.2.1. Material vegetal e isolados de <i>M. grisea</i>	53
4.2.2. Extração de RNA, isolamento de mRNA e síntese de cDNAs.....	54
4.2.3. Digestão dos ds cDNA	57
4.2.4. Pareamento e ligação de adaptadores específicos.....	57
4.2.5. Pré-amplificação dos fragmentos de ds cDNAs	58
4.2.6. Amplificação seletiva dos fragmentos de ds cDNAs-AFLP .	59
4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	60
4.2.8. Isolamento e re-amplificação dos cDNAs-AFLP.....	61
4.2.9. Reação de seqüenciamento.....	62
4.2.10. Análise da similaridade das seqüências.....	62
4.3. Resultados e Discussão	63
4.3.1. Identificação de genes envolvidos na interação entre..... <i>M. grisea</i> e arroz.....	63
4.3.2. Análise dos fragmentos re-amplificados.....	64
4.3.3. Análise da similaridade das seqüências.....	66
CAPÍTULO IV	73
5. Identificação de genes de resistência de espectro amplo envolvidos na interação entre <i>Magnaporthe grisea</i> e arroz através de hibridização subtrativa supressiva (SSH)	73
5.1. Introdução.....	73
5.2. Materiais e Métodos	75
5.2.1. Material vegetal e isolados de <i>M. grisea</i>	75
5.2.2. Extração de RNA, isolamento de mRNA e síntese de cDNAs	75
5.2.3. Controle da síntese dos cDNAs de fita simples.....	75
5.2.4. Controle da síntese dos cDNAs de fita dupla	76
5.2.5. Construção das bibliotecas de cDNAs-SSH.....	76
5.2.5.1. Digestão dos cDNAs com a enzima de restrição <i>Rsa</i> I	77
5.2.5.2. Pareamento e ligação de adaptadores	78
5.2.5.3. Controle da eficiência da ligação dos adaptadores aos cDNAs “tester”	79
5.2.5.4. Hibridização subtrativa primária.....	80
5.2.5.5. Hibridização subtrativa secundária	81
5.2.5.6. Amplificação supressiva primária.....	81
5.2.5.7. Amplificação supressiva secundária	82
5.2.6. Digestão dos produtos de amplificação.....	83
5.2.6.1. Ligação dos cDNAs-SSH no vetor pLITMUS™38i .	83
5.2.6.2. Ligação dos cDNA-SSH no vetor pCR® 4-TOPO®	84
5.2.6.3. Ligação dos cDNA-SSH no vetor pGEM®-T Vector Systems	85
5.2.7. Transformação das reações de ligações.....	85
5.2.8. Análise das colônias transformadas pela PCR.....	86

5.2.9. Reação de seqüenciamento.....	87
5.2.10. Análise da similaridade das seqüências.....	87
5.2.11. Macroarranjos de cDNAs	88
5.3. Resultados e Discussão	91
5.3.1. Síntese de cDNAs diferenciais através de SSH	91
5.3.2. Análise da similaridade das seqüências.....	95
5.3.2.1. Processo celular	103
5.3.2.2. Metabolismo	105
5.3.2.3. Processamento e armazenamento de informação.....	106
5.3.2.4. Outras categorias	108
5.3.2.5. Proteínas pouco caracterizadas	109
5.3.3. Análise da expressão diferencial por macroarranjos de cDNAs	110
6. CONCLUSÕES.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
8. APÊNDICES	138
9. VITA.....	142

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
INTRODUÇÃO	
1. Modelo biológico proposto para análise da expressão diferencial de genes relacionados à resistência à <i>M. grisea</i> em arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2003	3
CAPÍTULO II	
1. Escala de notas utilizadas para avaliar a resistência dos isolados....	44
2. Reações à brusone nas NILs, Oryzica Llanos 5 e Fanny quando submetidas a inoculações com oito isolados de <i>M. grisea</i> . IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003.....	45
3. Reações à brusone nas NILs quando submetidas a inoculações com dois isolados de <i>M. grisea</i> e tratamentos controles. IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003 e 2004.....	47
4. Reações à brusone nas cultivares de arroz quando submetidas a inoculações com dois isolados de <i>M. grisea</i> . IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003.....	48
CAPÍTULO III	
1. NILs de arroz, isolados de <i>M. grisea</i> e períodos de coleta do material vegetal horas após a inoculação (h.a.i.) utilizados na técnica de cDNA-AFLP. IRGA/ EEA, Cachoeirinha, RS, 2003	53
2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de cDNA-AFLP. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2003	59
3. Combinações de oligonucleotídeos iniciadores, número total de fragmentos identificados, monomórficos, polimórficos e re-amplificados obtidos através da técnica de cDNA-AFLP. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2003	64
4. Resumo dos resultados obtidos de BLAST dos clones seqüenciados isolados na técnica de cDNA-AFLP na interação entre <i>M. grisea</i> e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.	67
CAPÍTULO IV	
1. NILs de arroz, isolados de <i>M. grisea</i> e fenótipo do material coletado em 72 h.a.i. utilizados na técnica de SSH. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2004	77

2. Estratégia de obtenção das bibliotecas cDNAs-SSH para análise da expressão gênica diferencial na interação entre <i>M. grisea</i> e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2004	77
3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção dos adaptadores. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2004	79
4. Concentrações dos antibióticos utilizados para a seleção de <i>E. coli</i> transformadas com os diferentes vetores. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005	86
5. Sondas utilizadas para a seleção diferencial da expressão de genes relacionados à defesa na interação entre <i>M. grisea</i> e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005	90
6. Resumo dos resultados obtidos de BLAST dos clones seqüenciados isolados na técnica de SSH na interação entre <i>M. grisea</i> e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005	110

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
1. Conídios de <i>M. grisea</i> . Laboratório de Biotecnologia, IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003.....	12
2. A) sintomas da brusone em folhas, Laboratório de Biotecnologia, IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003. B) sintomas da brusone nas panículas e C) sintomas nos grãos, Fonte: Webster & Gunnell, 1992.	13
3. Representação diagramática da técnica de SSH. As linhas sólidas representam os cDNAs "tester" e "driver". Figura reproduzida de Diatchenko et al. (1996).....	35
CAPÍTULO II	
1. A) Casa-de-vegetação. B e C) Visão geral das caixas plásticas para inoculações. D) Planta de arroz a ser inoculada. E) Inoculações. F e G) Coleta do material para extração de RNA. IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003.....	43
CAPÍTULO III	
1. Perfis eletroforéticos do RNA total extraído de plantas de arroz. M - Marcador de 100 pb DNA. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2003.....	63
2. Perfis eletroforéticos dos fragmentos de cDNA-AFLP separados em gel de poliacrilamida. M - Marcador de 50 pb DNA. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2003.....	64
CAPÍTULO IV	
1. Perfis eletroforéticos das amostras amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores de actina. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	91
2. Perfis eletroforéticos do teste da eficiência da ligação dos cDNAs "tester" aos adaptadores Ad1 e Ad2R. Amostras 1 e 3: produtos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores FER senso e antisenso no cDNA "tester" ligado aos adaptadores Ad1 e Ad2R, respectivamente. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.....	93
3. Perfis eletroforéticos das ampliações supressivas primária (A) e secundária (B). Os números de 1 a 4 representam as quatro bibliotecas subtraídas e de 5 a 8 as bibliotecas não subtraídas. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	94

4. Perfis eletroforéticos das ampliações com os oligonucleotídeos iniciadores pUC/M13 em colônias recombinantes das quatro bibliotecas SSH. M1= marcador de 1 Kb DNA e M2= λ DNA/Hind III. P= controle positivo do vetor intacto (274 pb). LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	96
5. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca R1 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	101
6. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca S1 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	101
7. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca R2 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	102
8. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca S2 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.	102
9. Esquema da localização dos clones de cDNAs-SSH nos macroarranjos de cDNAs. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	113
10. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-C101A51-R; B1 e B2 com a sonda de cDNA-C101A51-S e C1 e C2, com a sonda controle negativo C101A51-H2O. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005. ...	114
11. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-C104LAC-R; B1 e B2 com a sonda de cDNA-C104LA-S e C1 e C2, com a sonda controle negativo C104LAC-H ₂ O. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	115
12. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-BR IRGA 410-S; B1 e B2 com a sonda de cDNA-IRGA 417-R e C1 e C2, com a sonda de cDNA-IRGA 420-R. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	116
13. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-Fanny-S; B1 e B2 com a sonda de cDNA-Fanny-H ₂ O; C1 e C2, com a sonda de cDNA-Oryzica Llanos 5-R e D1 e D2, com a sonda cDNA-Oryzica Llanos 5-H ₂ O. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	117
14. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com uma sonda controle de expressão constitutiva, gene actina. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.	118

LISTA DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE 1. Composição do meio de cultura SAP	139
APÊNDICE 2. Composição do meio de cultura LB líquido	140
APÊNDICE 3. Composição do meio de cultura LB sólido.....	141

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A_{260} ou A_{280} – absorvância em comprimento de onda igual a 260 ou 280 nanômetro

Ácido bórico - H_3BO_3

ATP – adenosina trifosfato

Blast – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – albumina sérica bovina

cDNA - DNA complementar ao mRNA

CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio

dNTPs – desoxirribonucleotídeos tri-fosfato

ds cDNA – cDNA de fita dupla

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

ESTs - Expressed Sequence Tags

g – grama

h.a.i. – horas após a inoculação

HEPES – ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etanossulfônico

IPTG – isopropionil β -D-tiogalactopiranosídeo

IRRI – International Rice Research Institute

Kb – quilobase (mil pares de bases)

L – litro

LB – Lúria-Bertani

M – molar

Mpb – mega pares de bases

mRNA – RNA mensageiro

MMLV – Moloney Murine Leukemia Virus .

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NILs - Near Isogenic Lines

nm – nanômetro

ng – nanogramas (10^{-6})

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

OD – densidade óptica

Oligo (dT) – oligo desoxitimidina trifosfato (oligonucleotídeo poli-T)

RNA – ácido ribonucléico

RT – transcriptase reversa

rpm – rotações por minuto

RT-PCR - Reação da Transcrição Reversa seguida da PCR

SDS - dodecil sulfato de sódio

ss cDNA – cDNA de fita simples

Taq – DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

TMV – Tobacco mosaic virus

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

U – unidade de atividade enzimática

v:v – volume por volume

x g – força centrífuga relativa à aceleração padrão da gravidade

X-gal – 5-bromo-4-cloro-2-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μg – micrograma (10^{-3})

μL – microlitro (10^{-3})

μM – micromolar

μm = micrômetro

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo. Um dos obstáculos para a manutenção e a estabilidade da produção é a suscetibilidade dos cultivares em uso à brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. O emprego de cultivares resistentes é o método mais eficiente e econômico, entretanto, a resistência tem se mostrado pouco durável.

A resistência das plantas contra o ataque de patógenos está relacionada com a expressão coordenada de respostas de defesa ativadas após a infecção. A ativação dessas respostas em parte depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno, através de mecanismos de percepção e transdução de sinais que envolvem alterações transitórias na membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de proteínas. Como consequência, ocorre a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula com a expressão subsequente de genes relacionados à defesa.

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em diversos processos biológicos, através de técnicas de análise de expressão diferencial global, pode contribuir decisivamente para acelerar os processos de melhoramento das espécies cultivadas através da obtenção de resistência de espectro amplo.

1.1. Objetivo geral

Identificar genes envolvidos na resposta de resistência à infecção de *M. grisea* em genótipos de arroz através de técnicas de expressão diferencial.

1.2. Objetivos específicos

1.2.1. Obter e caracterizar um banco de cDNAs, utilizando como modelo linhas quase-isogênicas (NILs = Near Isogenic Lines) de arroz, contendo os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-2*.

Hipótese: genes relacionados à resistência à *M. grisea* em arroz são coordenadamente expressos em distintas interações incompatíveis.

Estratégia experimental: foi avaliada a expressão diferencial de genes relacionados à resistência através de ensaios de inoculação, para a produção de uma biblioteca de cDNAs em duas NILs. Para testar esse modelo foram utilizadas as NILs C104LAC e C101A51, as quais possuem os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-2*, respectivamente. Foram utilizados isolados do patógeno que apresentam resposta de compatibilidade e incompatibilidade com as duas NILs (Tabela 1). As técnicas de análise de expressão utilizadas foram cDNA-AFLP e SSH. Os cDNAs obtidos foram seqüenciados para a comparação com as seqüências depositadas no GenBank.

1.2.2. Avaliar e comparar a expressão diferencial de mRNAs, através dos cDNAs isolados no modelo (1.2.1), em uma série de cultivares com resposta distinta à infecção com um isolado de *M. grisea*.

Hipótese: a expressão de genes relacionados à resistência é conservada em interações incompatíveis nos diferentes genótipos de arroz.

Estratégia experimental: foram utilizados os cultivares de arroz *Oryzica* Llanos 5 e Fanny, que apresentam resistência durável e suscetibilidade, respectivamente. *Oryzica* Llanos 5 possui resistência durável à brusone, mesmo sendo cultivado em uma área de 300.000 ha por mais de 10 anos. No Brasil esse cultivar também tem se mostrado resistente e é considerado um bom modelo para estudar mecanismos de resistência. Já o cultivar Fanny é altamente suscetível à maioria dos isolados do patógeno. Também foram testados os cultivares BR-IRGA 410, IRGA 417 e IRGA 420 que são cultivares elite do programa de melhoramento genético do IRGA, e que apresentam um histórico de respostas diferentes à brusone. A análise da expressão diferencial dos genes de resistência foi avaliada em ensaios de inoculação com um isolado de *M. grisea*. O RNA total das plântulas foi extraído e a expressão diferencial avaliada, utilizando os cDNAs obtidos no modelo (1.2.1), através da análise em um macroarranjo de cDNAs fixados em membrana (“reverse northern blot”).

TABELA 1. Modelo biológico proposto para análise da expressão diferencial de genes relacionados à resistência à *M. grisea* em arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2003

Genótipos dos Isolados de <i>M. grisea</i>	Genótipos das NILs de arroz	
	C104LAC (<i>Pi-1</i>)	C101A51 (<i>Pi-2</i>)
Isolado 1 (<i>Avr 1</i>)	Incompatível (R)*	Compatível (S)
Isolado 2 (<i>Avr 2</i>)	Compatível (S)**	Incompatível (R)

*R= Resistente e **S=Suscetível

CAPÍTULO I

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos mundialmente; sendo cultivado em 150 milhões de hectares com uma produção anual de 600 milhões de toneladas (FAO, 2005). O arroz é uma espécie pertencente à divisão Angiosperma, classe Monocotiledônea, ordem Poales, família Poaceae, subfamília Oryzoideae, tribo Oryzeae e gênero *Oryza* (Lu, 1999).

O gênero *Oryza* inclui mais de 20 espécies distribuídas em todos os continentes, as quais abrigam uma grande variabilidade de hábitos e formas e são encontradas em lagos de águas profundas, em florestas densas e em savanas. Além de *O. sativa*, também é cultivada a espécie *O. glaberrima* Steud. que é o arroz domesticado no oeste da África (Watanabe, 1997). O gênero *Oryza* possui diferentes genomas, A, B, C, D, E, F e as espécies são classificadas como diplóides ($2n=2x=24$) e tetraplóides ($2n=4x=48$), sendo 12 o número básico de cromossomos (Vaughan, 1994).

O arroz é originário da Índia, sendo hoje cultivado em todos os continentes, em países com regiões de clima temperado, subtropical e tropical.

Acredita-se que o arroz tenha se propagado do sudeste asiático para a China por volta do ano 3.000 a.C., quando foi levado para a Coreia e, posteriormente, para o Japão no século I a.C. Nas Filipinas, o arroz é cultivado desde o ano 2.000 a.C., provavelmente sendo proveniente da China. Da Índia, o arroz também foi levado para ilhas do Oceano Índico, principalmente Indonésia e Sri Lanka. Já a domesticação nas Américas deu-se em datas pós-colombianas, trazido por colonizadores espanhóis, portugueses e holandeses (Castro et al., 1999).

A domesticação de *O. sativa* ocorreu de forma independente na África e na Ásia. Na Ásia ocorreu a diferenciação em cultivares, dividindo-se em duas subespécies: *indica* e *japonica*. Os cultivares da subespécie *japonica* estão distribuídos nas regiões de clima temperado, enquanto os cultivares da subespécie *indica* distribuem-se em zonas tropicais e subtropicais. As duas subespécies possuem características morfológicas distintas e grande diversidade genética devido a processos diferentes de domesticação e seleção nos seus respectivos centros de diversidade (Matsuo et al., 1997).

O arroz é o principal alimento de dois terços da população mundial em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania. Na América Latina e no Caribe, o arroz também é a fonte mais importante de calorias e proteínas para a população (Roca et al., 1996), fornece 20 % de energia e 15% das proteínas necessárias ao homem (Azambuja et al., 2004).

O arroz ocupa, entre os cereais, o terceiro maior volume de produção mundial, e o segundo lugar para consumo humano, perdendo apenas para o trigo (Lopes, 2005). A Ásia ocupa a primeira posição em produção e consumo

mundiais; a América do Sul, a segunda em produção e a terceira em consumo. O Brasil é o nono produtor mundial de arroz (Azambuja et al., 2004). O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor do Brasil, correspondendo a mais da metade da produção nacional (IBGE, 2005), com uma produção de 6 milhões de toneladas na safra 2003/04 (IRGA, 2005a).

A produtividade da cultura do arroz no RS tem crescido continuamente ao longo dos anos. O marco significativo deste aumento ocorreu a partir do início da década de 80, com o desenvolvimento da pesquisa, e a conseqüente oferta aos agricultores dos cultivares de porte baixo e de altos rendimentos (Carmona et al., 1994). Entretanto, um dos graves obstáculos para a manutenção da estabilidade desta produção reside na suscetibilidade dos cultivares atualmente em uso a doenças.

2.1.1. Principais doenças da cultura do arroz no sul do Brasil

Na região Sul do Brasil várias doenças afetam a cultura do arroz prejudicando a produtividade e a qualidade dos grãos colhidos. Entre essas doenças, a principal é a brusone, causada por *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. Os danos devido à brusone podem comprometer em até 100 % da produção de algumas lavouras nos anos de ataques severos. Por ordem de importância nos últimos anos, seguem-se as manchas de glumas (vários fungos e bactérias), a queima das bainhas [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (teleomorfo)], a podridão do colmo [*Magnaporthe salvinii* (Cattaneo) R. Krause & Webster (teleomorfo)], a mancha parda [*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Dastur (teomorfo)], a mancha estreita

[*Sphaerulina oryzina* K. Hara (teleomorfo)], a escaudadura da folha [*Monographella albescens* (Thümen) Parkison, Sivanesan & Booth = *Metasphaeria albescens* Thümen (teleomorfo)], a podridão do colar [*Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth = *Acrocyllindrum oryzae* Sawada (anamorfo)], a cárie ou o carvão preto do grão [*Tilletia barclayana* (Bref.) Sacc. & Syd. In Sacc. = *Neovossia horrida* (Takah.) Padwick & A. Khan], a ponta branca [*Aphelenchoides besseyi* Christie (nematóide)] e a podridão das bainhas [*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough (teleomorfo)] (IRGA, 2005b). Mais recentemente, o enrolamento do arroz, cujo agente causal é o Rice Stripe Necrosis Virus (RSNV), surgiu como uma doença da cultura (Maciel et al., 2002).

O emprego de cultivares resistentes é o método mais eficiente e econômico para o controle da brusone do arroz. Entretanto, tem sido verificado que os cultivares resistentes têm apresentado uma vida útil de dois a três anos após o seu lançamento, forçando o lançamento de novas variedades (Zeigler et al., 1994). A perda da resistência dos cultivares à brusone em poucos anos pode ser atribuída à presença de raças previamente não identificadas do patógeno no campo no momento da liberação do novo cultivar e ainda à alta variabilidade do patógeno (Zeigler et al., 1994; Roca et al., 1996).

2.1.2. Genômica estrutural

Além da importância econômica, o arroz foi selecionado como modelo para estudo da genômica em cereais (Xu et al., 2005). Algumas características contribuem para esse fato, entre as quais: ser uma espécie diplóide; possuir

um genoma pequeno (430 Mpb- Mega pares de bases) (Arumuganathan & Earle, 1991); apresentar sintonia de seu genoma com os de outros cereais (Gale & Devos, 1998); possuir um mapa molecular com mais de 10.000 marcadores; e ter as duas subespécies, *indica* e *japonica* seqüenciadas (Causse et al., 1994; Harushima et al., 1998; McCouch et al., 2002; Yu et al., 2002; Wu et al., 2002; Chen et al., 2002; Goff et al., 2002). O arroz possui também uma vasta fonte de recursos genéticos: mutantes, espécies silvestres, cultivares, linhagens, linhas quase isogênicas (NILs- Near Isogenic Lines) e populações mapeadas. Além disso, estão disponíveis mais de 300.000 seqüências-alvo expressas (ESTs- Expressed Sequence Tags) e mais de 28.000 clones de cDNAs com seqüências completas (The Rice Full-Lenght cDNA Consortium, 2003).

Diversos projetos de seqüenciamento do genoma do arroz foram realizados gerando um grande número de seqüências depositadas em bancos de genes. Três projetos utilizaram o cultivar Nipponbare da subespécie *japonica* e um projeto o cultivar 93-11 da subespécie *indica*. O cultivar Nipponbare de arroz serviu como base para o Projeto Internacional de Seqüenciamento do Genoma do Arroz (IRGSP), por ter sido utilizada como parental da população F₂ para a elaboração do mapa de ligação, do mapa de YACs, fonte de mRNA para a construção de uma biblioteca de cDNAs e obtenção dos ESTs (Sasaki et al., 2000).

Duas empresas privadas, Monsanto e Syngenta, também realizaram o seqüenciamento do genoma do arroz do cultivar Nipponbare. Dois trabalhos publicados simultaneamente por Wu et al. e Chen et al., em março de 2002,

apresentaram estudos complementares que aumentaram o número de ESTs mapeados além de um refinado mapa físico cobrindo 90 % do genoma do arroz. Um rascunho das seqüências dos genomas das subespécies *japonica* e *indica* foi realizado por Yu et al. (2002) e Goff et al. (2002), respectivamente. A comparação dos genomas das duas subespécies revelou pouca diferença no conteúdo de genes, mas grandes diferenças na estrutura das regiões intergênicas (Yu et al., 2005).

Esses avanços fazem da cultura do arroz o modelo mais importante para estudo de monocotiledôneas e, conseqüentemente, trazem informações relevantes para o melhoramento genético, não somente do arroz, mas para diversos sistemas biológicos. O maior desafio na era pós-genômica está na descoberta de métodos sistemáticos para associar funções biológicas aos genes seqüenciados. Nesse contexto, ferramentas como marcadores moleculares, isolamento de genes baseado nos mapas, silenciamento de genes induzido por vírus (VIGS) ou por outros RNAs interferentes e a inativação de genes pela inserção de elementos genéticos móveis, como os transposons e os retrotransposons, constituem mecanismos para o descobrimento da função biológica das seqüências geradas.

2.2. A brusone do arroz

O primeiro relato da brusone do arroz foi citado no ano de 1637, na China por Soong Ying-Shin, em seu livro "Utilization of Natural Resources". Posteriormente, relatos da presença da doença foram feitos no Japão, na Itália, nos Estados Unidos e na Índia (Ou, 1972a). A brusone passou a ser

caracterizada como a mais devastadora doença da cultura do arroz, a partir de 1919, quando ocorreu uma epidemia devastadora na Índia.

A importância da brusone do arroz deve-se à sua ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os ambientes onde se produz a cultura (Ou, 1985; Bonman, 1992). A brusone do arroz foi identificada em 85 países de regiões temperadas, tropicais e subtropicais (Ou, 1972b; Roca et al., 1996).

M. grisea pode infectar mais de 50 espécies, na sua maioria cereais e plantas daninhas comuns em lavouras de arroz. Entre eles: cevada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), aveia (*Avena sativa* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* L.) entre outras (Ou, 1980, Takabayashi, et al., 2002), e gramíneas daninhas *Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf, *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *Panicum repens* L., *Pennisetum purpureum* (Schumach.), *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd., *Digitaria ciliaris* (Retz.), Koch, *Echinochloa colana* (L.), Link, *Leersia hexandra* Sw., *Rottboellia exaltata* L. e *B. distachya* (L.) Stapf. (Mackill & Bonman, 1986). Embora a gama de hospedeiros seja restrita, relatos ocasionais de infecção cruzada de arroz por isolados de outras plantas têm conduzido à especulação de que a população do patógeno em plantas daninhas pode ser fonte de inóculo para a brusone do arroz (Borromeo et al., 1993).

Outra cultura que vem sofrendo com a doença é o trigo. A brusone do trigo foi constatada no Brasil em 1985, sendo essa a primeira observação da doença em condições naturais no mundo (Igarashi et al., 1986). Em experimentos preliminares de inoculação de *M. grisea* verificou-se infecção em

arroz, trigo e cevada pelo mesmo isolado do fungo do arroz. A brusone do trigo tem despertado a atenção de pesquisadores de vários países, devido à importância da cultura no contexto mundial.

2.2.1. Etiologia

A brusone do arroz é causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, anamorfa *Pyricularia grisea* (Cooke) Saccardo (Rossman et al., 1990), pertence ao Filo Ascomycota, Classe Hemiascomycetes, Diaporthales e Magnaporthaceae (Luz, 2001). Inicialmente, *P. grisea* foi denominado de *Trichothecium griseum* Cooke (Cooke & Ellis, 1879) e, em 1880, como espécie pertencente ao gênero *Pyricularia*, descrito por Saccardo.

A fase teleomórfica de *P. grisea* foi descoberta por Hebert em 1971, sendo denominada de *Ceratosphaeria grisea*. Hebert descreveu e classificou *M. grisea* como fungo heterotático, com peritécio marrom escuro a preto, podendo apresentar-se isoladamente ou em grupos, aparentemente sem estroma, com a base parcialmente ou inteiramente embebida no substrato. Possui ascósporos hialinos, fusiformes, com três septos em uma asca unitunicada e cilíndrica, que se desenvolve na base do peritécio e são liberados após a sua germinação. Em 1977, foi reclassificado no gênero *Magnaporthe* por Barr.

A teleomorfa raramente é encontrada na natureza. Isolados sexualmente férteis foram observados na Índia (Kumar et al., 1999) e na Tailândia (Mekwatanakarn et al., 1999). A importância dessa fase no campo ainda não é conhecida, embora a fase sexual seja uma forma potencial de se obter

variabilidade genética (Rossman et al., 1990). A inexistência de isolados compatíveis na maioria das regiões orizícolas distantes dos centros de origem do arroz impede a ocorrência da reprodução sexuada, resultando no predomínio de populações clonais do patógeno (Mekwatanakarn et al., 1999; Viji & Gnanamanickam, 1998). Assim, o ciclo sexual não parece ser uma fonte de variação para os isolados de *M. grisea* que infectam arroz em áreas longínquas do centro de origem da cultura.

A anamorfa do fungo, *P. grisea*, é a mais encontrada na natureza, produzindo conídios piriformes, hialinos e que apresentam três septos (Howard & Valent, 1996), (Figura 1).

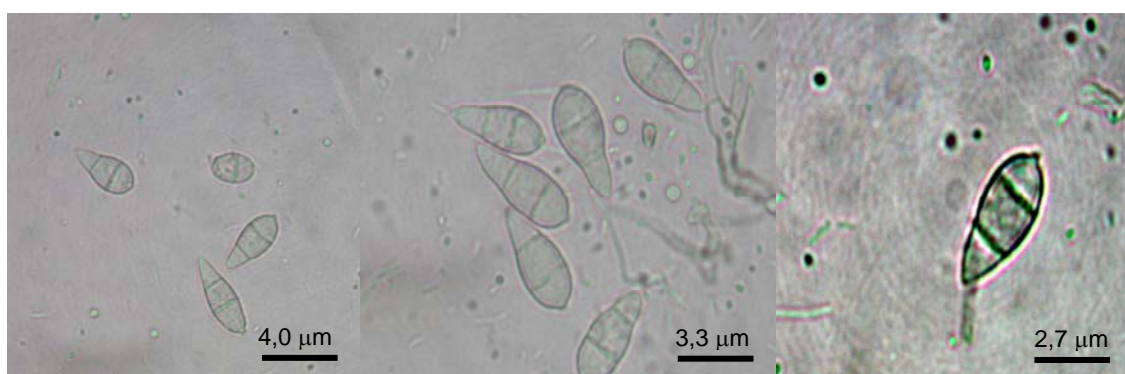


FIGURA 1. Conídios de *M. grisea*. Laboratório de Biotecnologia, IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003.

A conidiogênese em *M. grisea* é holoblástica, ou seja, os conídios são formados por um poro no ápice do conidióforo (Howard, 1994). Uma única lesão pode produzir de 2.000 a 6.000 conídios/dia por um período de até 14 dias, com vários ciclos de infecção e reprodução durante uma estação de desenvolvimento da cultura (Couch et al., 2005).

2.2.2. Sintomatologia

A brusone do arroz pode ocorrer em toda a parte área da planta, desde os estágios iniciais de desenvolvimento até a fase final da produção de grãos (Bedendo, 1997). Os sintomas mais característicos são manchas nas folhas (Figura 2 - A), nas panículas (Figura 2 – B), nos colmos e nos grãos (Figura 2 - C).



FIGURA 2. A) sintomas da brusone em folhas, Laboratório de Biotecnologia, IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003. B) sintomas da brusone nas panículas e C) sintomas nos grãos, Fonte: Webster & Gunnell, 1992.

Nas folhas, os sintomas iniciam-se com a formação de pequenas lesões necróticas de cor marrom, que evoluem, aumentando de tamanho, tornando-se elípticas, com margem marrom e centro esporulativo cinza ou esbranquiçado (Agrios, 2005). Nas bainhas das folhas, principalmente na região da lígula da folha bandeira, é comum o surgimento de lesões circundantes que podem levar à queda da folha. Em condições favoráveis, as lesões coalescem, causando a morte das folhas e muitas vezes da planta inteira.

Nos colmos, principalmente na região dos entrenós, os sintomas aparecem sob a forma de manchas elípticas escuras, com centro cinza e bordos marrom avermelhados. Na região dos nós, a área infectada torna-se

escura, impedindo a circulação da seiva e provocando o acamamento da planta, ou ainda, a quebra do colmo no ponto de infecção do nó. A infecção no primeiro nó, abaixo da panícula, é conhecida como brusone do pescoço. Diversas partes da panícula, como ráquis, ramificações primárias, secundárias e pedicelos também podem ser infectadas (Prabhu et al., 2002; Agrios, 2005). Caso a infecção ocorra logo após a emissão da panícula, não há formação de grãos e a planta permanece ereta. Quando a panícula é infectada tardiamente, ocorre o enchimento parcial dos grãos, e em alguns casos, a quebra da base da panícula devido ao peso dos grãos (Agrios, 2005). Quando a infecção ocorre antes da fase leitosa, a panícula inteira morre, apresentando coloração parda (Prabhu et al., 2002).

O trabalho publicado por Sesma & Osbourn (2004) evidenciou a capacidade de isolados de *M. grisea* infectar também as raízes de cultivares de arroz e causar sintomas característicos de patógenos de solo. Essa capacidade de infectar raízes e causar sintomas levou à reclassificação taxonômica de *M. grisea* como pertencente a Magnaporthaceae. Nessa família encontram-se os importantes patógenos de solos entre eles *Gaeumannomyces graminis*, agente causal do mal-do-pé em trigo.

2.2.3. Ciclo da brusone do arroz

A brusone do arroz é considerada uma doença policíclica e todas as fases dos ciclos, desde a germinação dos esporos até o desenvolvimento das lesões, são altamente influenciadas pelas condições climáticas. O ciclo primário é iniciado depois de um período de sobrevivência em restos culturais, quando

cultivares suscetíveis são expostos ao inóculo sob condições ambientais favoráveis. O patógeno sobrevive as estações de cultivo na forma de micélio e de conídios sobre a palha, sementes e em invasoras hospedeiras. Nos trópicos os conídios estão presentes no ar o ano todo (Agrios, 2005).

A infecção de *M. grisea* tem início quando o conídio entra em contato com a superfície das folhas de arroz, rompe a cutícula e libera uma substância adesiva pelo ápice do esporo que auxilia a sua fixação à superfície foliar do hospedeiro (Hamer et al., 1988).

A germinação dos conídios e a formação do apressório ocorrem em resposta a diferentes estímulos ambientais. A presença de água livre é fundamental para que ocorra a germinação. O apressório é uma estrutura de infecção altamente especializada, que se adere à superfície foliar através da formação de um grampo de penetração. A alta pressão de turgor se deve à acumulação de glicol e ao reforço da parede celular do apressório através da melanina (Howard et al., 1991; Talbot, 2003; Tongen et al., 2005). Uma vez na planta, o fungo desenvolve hifas e rapidamente coloniza o tecido hospedeiro. As primeiras lesões são observadas dentro de quatro a cinco dias após a penetração. Na presença de alta umidade relativa, os conídios são produzidos e liberados em menos de 24 h depois do aparecimento das lesões, sendo que a maior produção de conídios ocorre entre 3 a 8 dias após o início da esporulação. Esses conídios são facilmente liberados e dispersos, proporcionando o inóculo para o próximo ciclo da doença.

A brusone é favorecida quando a cultura do arroz é desenvolvida pela fertilização excessiva com nitrogênio (acima de 60 Kg de N.ha⁻¹), pela longa

duração de umidade nas folhas devido a períodos de chuva ou de orvalho, pela ausência de vento noturno e pelas temperaturas noturnas entre 17 e 23 °C (Webster & Gunnell, 1992). A temperatura ideal para a produção e liberação de conídios varia entre 20 a 25 °C e a umidade relativa do ar deve ser superior a 90 %.

2.2.4. Controle da brusone do arroz

O manejo integrado da brusone requer um conjunto de medidas como a resistência genética do cultivar, as boas práticas culturais e, em determinados casos, o controle químico (Prabhu et al., 2002). Entre as principais recomendações para a adoção de práticas culturais de manejo no controle da brusone do arroz, destacam-se: a semeadura em época apropriada; adubação equilibrada e a manutenção de lâmina de água durante o ciclo da cultura (Roca et al., 1996; IRGA, 2001).

O uso de sementes de boa qualidade fisiológica e fitossanitária; a destruição de plantas voluntárias e doentes; o escalonamento da época de semeadura; o plantio com densidade entre 120 e 150 kg/ha; são algumas medidas de controle recomendadas para a prevenção da brusone em terras altas (EMBRAPA, 2005). A aplicação de fungicidas durante os estádios de emborrachamento e floração é um método complementar, principalmente em áreas com condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da doença (EMBRAPA, 1999).

2.3. Genes de resistência à brusone do arroz

O desenvolvimento de cultivares com resistência durável à brusone é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético do arroz. A resistência é considerada durável quando permanece efetiva em uma variedade cultivada em grande extensão, por um longo período em um ambiente favorável para o desenvolvimento da doença (Johnson, 1984). Alguns exemplos de resistência durável à brusone em arroz são os cultivares Moroberekan (Bonman & Mackill, 1988), o cultivar Gumei 2 (Peng et al., 1992), o cultivar IR36 (Bonman, 1992) e o cultivar Oryzica Llanos 5, que foi desenvolvida pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT – International Center for Tropical Agriculture) (Correa-Victoria & Zeigler, 1995).

A resistência à brusone do arroz é governada por genes de efeito maior e genes de efeito menor. Análises genéticas para a resistência governada por genes de efeito maior iniciaram no ano de 1960, quando foi estabelecida uma série diferencial de cultivares para a identificação de raças de *M. grisea* no Japão (Ou, 1985). Mais tarde, Ling & Ou em 1968 selecionaram 8 variedades de arroz e desenvolveram uma série internacional para a diferenciação de raças de *M. grisea*. No ano de 1992, em um programa do IRRI (International Rice Research Institute) nas Filipinas, uma série de NILs resistentes à brusone do arroz foram desenvolvidas por Mackill & Bonman (1992). As NILs são genótipos idênticos, exceto pela presença de um gene de resistência de efeito maior (*R*). Os genes de resistência de efeito maior à brusone em arroz são denominados de *Pi*. As NILs foram obtidas através da introgressão de genes de resistência de efeito maior de quatro cultivares (LAC23, 5173, Pai-Kan-Tao

e Tetep) na NIL C039 subespécie *indica*. Cada NIL possui um ou dois genes de resistência de efeito maior. As NILs permitiram a identificação de novos genes de resistência: C104LLAC (*Pi-1*), C101A51 (*Pi-2*), C104PKT (*Pi-3*), C101PKT (*Pi-4^a*), C105TTP-4 (*Pi-4^b*) e IR1529 (*Pi-11*) e a vantagem para estudar a brusone do arroz nos trópicos.

Em estudos realizados por Chen et al. (1996), observou-se que a NIL C101A51 (*Pi-2*) foi resistente a 455 isolados coletados em diferentes regiões das Filipinas e suscetível a somente um isolado. Extensivos testes a campo foram conduzidos em vários países e indicaram que o gene *Pi-2* é um fator importante para a durabilidade da resistência.

Atualmente, mais de 40 genes de resistência de efeito maior à brusone foram identificados (Kinoshita, 1991; Mackill & Bonman, 1992; Wang et al., 1994, McCouch et al., 1994; Chauhan et al., 2002; Berruyer et al., 2003; Sallaud et al., 2003; Liu et al., 2004; Chen et al., 2005; Liu et al., 2005a) e 25 foram mapeados através de marcadores moleculares (Wu et al., 2005). Esses genes estão distribuídos em 10 dos 12 grupos de ligação do genoma do arroz (ausentes nos cromossomos 3 e 9). Alguns estão organizados em grupos nos cromossomos 6, 11 e 12.

Wang et al. (1994) localizaram o gene *Pi-7(t)* no cromossomo 11 utilizando linhas recombinantes (RILs) de arroz provenientes do cruzamento entre Moroberekan, cultivar reconhecido por apresentar resistência durável e a NIL CO39. Esse grupo foi o primeiro a identificar genes de efeito menor, através de QTLs (Loci de Características Quantitativas) para a resistência à brusone em arroz utilizando três componentes: porcentagem de área foliar

infectada, número e tamanho de lesões (McCouch et al., 1994). O cultivar Gumei 2, que apresenta resistência durável à brusone do arroz, vem sendo testado durante 12 anos de cultivo em 34 áreas experimentais na China (Peng et al., 1992). A fim de entender a base genética que governa a resistência à brusone no cultivar Gumei 2 e utilizá-la como fonte de resistência durável em arroz, Wu et al. (2005) analisaram a segregação de 304 linhas recombinantes do cruzamento Zhong 156/Gumei 2 e construíram um mapa de ligação com 181 marcadores de DNA. Os resultados revelaram que a resistência durável no cultivar Gumei 2 é governada por três genes de resistência de efeito maior: *Pi25(t)*, *Pi26(t)*, e um terceiro ainda não identificado; além de 8-9 genes de efeito menor.

O programa de melhoramento genético do arroz do CIAT estabeleceu metodologias de avaliação e seleção em viveiros de avaliação desde 1985. Nessas condições, o melhoramento é realizado sob alta pressão da doença, favorecida por condições ambientais ideais e uma alta diversidade de virulência do patógeno (Correa-Victoria & Zeigler, 1995). Este método resultou no lançamento do cultivar Oryzica Llanos 5 que tem se mantido resistente por mais de 10 anos à brusone do arroz.

2.4. Mecanismos moleculares envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz

2.4.1. Fatores de reconhecimento

A interação gene-a-gene entre plantas e patógenos foi descrita pela primeira vez por Flor em 1942, como resultado de seus estudos com o

patossistema *Melampsora lini* x *Linum usitatissimum*. Flor postulou que a resistência de determinado cultivar de linho a uma raça do fungo é o resultado da interação dos produtos de um gene de avirulência dominante (*Avr*) no patógeno e de um gene de resistência dominante (*R*) correspondente na planta hospedeira.

Uma possível explicação molecular da interação gene-a-gene proposta por Flor (1942) é o modelo receptor-elicitor, no qual o gene de resistência do hospedeiro codifica uma proteína receptora que reconhece uma molécula elicitora produzida pela patógeno (Jia et al., 2000). Os genes *Avr* podem codificar proteínas, que são reconhecidas diretamente pelo produto do gene *R* correspondente, ou ainda, podem codificar enzimas envolvidas na produção de pequenas moléculas elicitoras ou ligantes, que servem como fatores de reconhecimento (Orbach et al., 2000), ambas levando à incompatibilidade (ausência de doença). Por outro lado, caso o patógeno não possua um gene *Avr* correspondente ao gene *R* no hospedeiro, este não será reconhecido pela planta, resultando em uma interação compatível (presença de doença). A ausência de um dos determinantes leva à perda da resistência (Rathjen & Moffett, 2003). Sob condições de cultivo, o que leva à perda da resistência é a ocorrência de uma mutação em um gene *avr* e o aumento da frequência desse mutante na população do patógeno.

A resistência pode ser definida como a habilidade do hospedeiro para dificultar ou parar a colonização pelo patógeno (Parlevliet, 1997). A resistência está associada, freqüentemente, à resposta de hipersensibilidade (HR - hypersensitive response), que consiste na morte rápida de um número limitado

de células em torno do sítio inicial de infecção (Delaney, 1997). Após a formação das lesões, consequência da HR, as plantas desenvolvem resistência de espectro amplo ao ataque de patógenos, tanto no local da inoculação, denominada de LAR (Resistência Local Adquirida), como também em partes não inoculadas da planta, chamada de SAR (Resistência Sistêmica Adquirida).

A SAR foi demonstrada em várias interações planta-patógeno levando a uma proteção de espectro amplo e de maior duração sendo efetiva contra outros patógenos como vírus, fungos e bactérias (Ryals et al., 1996; Baker et al., 1997; Herms et al., 2002). A SAR é duradoura e de espectro amplo após a infecção por patógenos que causam necrose e ocorre em diversas espécies de plantas (Moraes, 1998). A resposta de SAR inclui a produção de compostos antimicrobianos, a formação de lignina, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) e a ativação de genes de resposta de defesa, que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs – Pathogenesis-related). Parte da resistência de plantas a doenças está relacionada com respostas complexas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com o patógeno. A ativação dessas respostas nas plantas depende basicamente da velocidade do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno através de mecanismos de percepção e transdução de sinais. A transdução de sinais envolve alterações transitórias no fluxo de íons na membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Como consequência, ocorre a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal com a subsequente expressão de genes de resposta

de defesa (Lamb et al., 1989; Baker et al., 1997; Song & Goodman, 2001; Ayliffe & Lagudah, 2004).

A interação entre *M. grisea* e arroz é um modelo clássico da teoria gene-a-gene de Flor (1942) e foi demonstrada por vários estudos envolvendo este patossistema (Zeigler et al., 1994; Bryan et al., 2000; Jia et al., 2000).

Apesar de já terem sido identificados mais de 40 genes de resistência de efeito maior à brusone em arroz, apenas os genes *Pib* (Wang et al., 1999) e *Pi-ta* (Bryan et al., 2000) foram clonados. A análise de seqüências de cultivares resistentes, intermediárias e suscetíveis revelou que a proteína Pi-ta em variedades suscetíveis possui apenas a substituição de um único aminoácido. Mais de 40 % de plantas transgênicas expressando o gene *Pi-ta* conferiram resistência total ou parcial à brusone. O isolamento do gene de avirulência *AVR-Pita* (Orbach et al., 2000) de *M. grisea* e o complementar gene de resistência *Pi-ta* (Bryan et al., 2000) de arroz levaram ao entendimento molecular da interação gene-a-gene (Jia et al., 2000).

M. grisea é um patógeno hemibiotrófico que cresce intracelularmente e, antes de colonizar células próximas, ocupa as células individualmente. Análises moleculares evidenciaram a ligação da proteína do gene *Avr-Pita* com o domínio de regiões ricas em leucina (LRR) do gene de resistência *Pi-ta*. Além disso, deleções de apenas um aminoácido de ambos os genes, levaram à perda total da resistência. Esses resultados sugerem a interação da proteína do gene de resistência com a proteína do gene de avirulência e o início da transdução de sinais (Jia et al., 2000).

2.4.2. Transdução de sinais

As plantas percebem os sinais externos (elicitores), normalmente oligossacarídeos e glicoproteínas, que são reconhecidos pelos domínios das proteínas codificadas pelos genes de resistência via membrana plasmática. Isso resulta na acumulação intracelular de moléculas sinais e a indução da cascata de fosforilação/desfosforilação para a expressão de genes de resposta de defesa (Dixon & Lamb, 1990). Os elicitores podem ser ainda produzidos pela própria planta e liberados pelo ataque de enzimas hidrolíticas, as quitinases e as glucanases. Enzimas hidrolíticas inibem o desenvolvimento de fungos *in vitro* por hidrolisar quitina e β -glucanos, constituintes da parede celular de fungos. Os produtos da digestão desses constituintes da parede celular de fungos podem atuar como elicitores e estimular a resposta de defesa. As enzimas hidrolíticas têm sido utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças. Plantas transgênicas expressando um gene de quitinase apresentaram resistência à brusone do arroz (Nishizawa et al., 1999). A análise de expressão de genes envolvidos na interação entre *Fusarium graminearum* e trigo (*Triticum aestivum* L.) permitiu o isolamento de genes que codificam para quitinases e β -1,3 glucanases (Li et al., 2001).

A produção de ROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (OH) e superóxido (O_2) é um dos primeiros eventos da transdução de sinais (Lamb & Dixon, 1997; Resende et al., 2003). A presença de ROS foi avaliada em interações compatíveis e incompatíveis entre plântulas de arroz e isolados de *M. grisea*. Porém, altos níveis de H_2O_2 foram verificados somente na interação incompatível (Ganesan & Thomas, 2001).

A fim de elucidar os mecanismos moleculares da interação entre *M. grisea* e arroz, Kim et al. (2000) trataram culturas de células em suspensão de arroz com um elicitor de *M. grisea*. Combinando um método de análise de expressão gênica diferencial e de validação de bibliotecas de cDNAs, foi possível identificar vários cDNAs relacionados ao processo de reconhecimento, à transdução de sinais e à expressão de genes de defesa ativados somente na interação incompatível. Dois clones de cDNAs apresentaram alta similaridade com uma seqüência de mamíferos com um domínio de ligação dependente de Ca^{+2} , outros cDNAs apresentaram homologia de seqüências com peroxidases, lisofosfolipases e uma proteína MAP quinase com domínio serina/treonina. Nesse estudo também foi identificado um clone de cDNA com homologia a fatores de transcrição específicos de genes de defesa. O gene *OsSBP* de arroz, que codifica uma proteína de ligação de selênio homóloga a uma proteína de mamíferos, foi isolado quando induzido com um elicitor produzido por *M. grisea*. Plantas transgênicas de arroz contendo o gene *OsSBP* resultaram na acumulação de H_2O_2 e na resistência a uma raça antes virulenta de *M. grisea*, bem como, na resistência à requeima bacteriana causada por *Xanthomonas oryzae* patovar *Oryzae* (Sawada et al., 2004).

As peroxidases (PRXs) são membros de um grupo de glicoproteínas presentes em quase todos os organismos. As PRXs têm papel importante na produção de ROS e estão envolvidas em processos de espessamento e lignificação da parede celular. Um membro da família das PRXs foi identificado em trigo, tanto na presença do patógeno como na presença de indutores químicos como: metil jasmonato (MeJA), etileno (ET), óxido nítrico (NO) e H_2O_2

(Liu et al., 2005b). Em arroz, duas ascorbato peroxidases denominadas *OsAPX1* e *OsAPX2* (*OsAPX1/2*), foram identificadas na resposta a elicitores como ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ET, e H_2O_2 , além da infecção por *M. grisea*. A caracterização da expressão gênica de *OsAPX1/2*, induzido por compostos químicos específicos e pela presença de *M. grisea*, foi realizada por Agrawal et al. (2003). Nenhuma lesão foi visível em uma interação compatível até 60 horas após a inoculação (h.a.i.) com isolados de *M. grisea*, sendo que após 72 h, lesões típicas de brusone tornaram-se visíveis em toda a área inoculada. Por outro lado, em interações incompatíveis as plantas apresentaram HR em 36 h.a.i. Os resultados da expressão gênica de *OsAPX1/2* em interações compatíveis mostraram a indução em 24 h, seguido do declínio entre 48 e 72 h. Já na interação incompatível ocorreu um aumento da expressão dos genes *OsAPX1/2* entre 24 e 48 h.a.i. seguindo pela ausência completa após 72 h.

Os primeiros eventos da transdução de sinais em plantas envolvem respostas ativas como o fluxo de íons, a produção ROS, a ativação de G-proteínas, a geração de óxido nítrico, fosfolipases e a fosforilação de proteínas (Song & Goodman, 2002). As fosfolipases são enzimas capazes de gerar lipídios que atuam como mensageiros secundários na transdução de sinais. Uma fosfolipase denominada de *OsPI-PLC1* (rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene) de arroz foi clonada e caracterizada por Song & Goodman (2002). A indução de *OsPI-PLC1* foi verificada pelo tratamento com vários indutores químicos de SAR e pela inoculação com isolados

incompatíveis indicando que o gene *OsPI-PLC1* está envolvido na cascata de transdução de sinais e intermediando a resistência à brusone em arroz.

O processo de fosforilação de proteínas é um dos mecanismos principais para a rápida modulação de fatores de transcrição em resposta a sinais extracelulares perceptíveis pela célula (Somssich, 1997). O processo de fosforilação é realizado pela cascata de sinais da proteína MAP quinase (MAPK). A cascata de transdução de sinais parece ser conservada em eucariotos e consiste de uma MAPKK quinase (MAPKKK), uma MAPK quinase (MAPKK) e uma MAP quinase (MAPK). A ativação de uma MAPK ocorre através da fosforilação de um domínio serina/treonina que é catalisada pela MAPKK, que por sua vez é ativada através da fosforilação de um domínio serina catalisada pela MAPKKK (Hunter, 1995). As três proteínas MAPK são responsáveis pela percepção de estímulos extracelulares, através de receptores da membrana plasmática, que devem ser levados para o núcleo. Uma proteína MAP quinase (BWMK1) foi identificada por He et al. (1999) e apresentou envolvimento na transdução de sinais da interação entre *M. grisea* e arroz.

Centenas de G-proteínas foram identificadas em diferentes organismos com função de mediadoras na transdução de inúmeros sinais extracelulares que interagem com receptores presentes na membrana plasmática de mamíferos e leveduras. As GTPases, freqüentemente denominadas de G-proteínas da subfamília Ras, são responsáveis por alterações moleculares nos processos bioquímicos (Hall & Zerial, 1995) e estão envolvidas na transdução de sinais dos processos de crescimento e de diferenciação celular, regulando a

expressão de muitos genes em animais. Sano & Youssefian, (1991) identificaram em arroz uma GTPase denominada de RGP1. Plantas transgênicas de fumo expressando o gene *rpg1* apresentaram resistência ao Tobacco mosaic virus (TMV), além de um porte baixo e elevados níveis de citocininas (Yoda & Sano, 2003). Kato et al. (2004) identificaram dois genes que codificam para subunidades complexas das G-proteínas, as quais foram localizadas na membrana plasmática de arroz e assim como em animais e leveduras, também estão envolvidas na percepção de sinais.

As plantas também respondem ao ataque de patógenos pela síntese de moléculas sinais. Em arroz, Ganesan & Thomas (2001), verificaram um aumento no nível de H_2O_2 em resposta ao tratamento com ácido salicílico (SA) e inoculação com isolados de *M. grisea*, culminando em um mecanismo de defesa celular. Mutantes *cdr* (cell death and resistance) que apresentaram resistência à brusone, também exibiram altos níveis de H_2O_2 (Takahashi et al., 1999). Entre os componentes químicos já relatados na literatura estão SA, benzotiodiazol (BTH), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) e probenazole (Schaffrath et al., 2000). O gene *RPR1* de arroz, por exemplo, foi clonado a partir de plantas tratadas com probenazole (Sakamoto et al., 1999). A expressão de *RPR1* foi induzida por SAR, através da aplicação de SA, BTH e pela inoculação por *M. grisea*.

Agrawal et al. (2002) investigaram o papel do gene *OsPHGPX* (rice phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) na resposta de defesa com a aplicação de moléculas sinalizadoras como o JA, SA, ABA, etileno, inibidores da proteína fosfatase e inoculação com isolados de *M. grisea*. O aumento dos

níveis de mRNA do gene *OsPHGPX* por parte de moléculas sinalizadoras e inibidores da proteína fosfatase foi altamente influenciada pela luz.

A indução de SAR tem sido intensivamente estudada devido ao interesse na resistência e à possibilidade de identificar genes de efeito menor que proporcionem uma resistência durável em plantas. Esses estudos estão baseados na análise da expressão gênica diferencial, a qual ocorre em todas as fases de desenvolvimento de um organismo. A identificação desses genes é um primeiro passo no sentido de entender a função gênica e os mecanismos moleculares de um sistema biológico específico (Galindo et al., 1998).

2.4.3. Respostas de defesa

O surgimento da resistência está ligado à expressão coordenada de uma classe de genes que codificam proteínas de defesa denominadas de PRs. As PRs têm sido bem estudadas e caracterizadas na resposta de defesa em plantas, principalmente em dicotiledôneas. O termo PR descreve um grupo numeroso de produtos gênicos vegetais induzidos em resposta à invasão de patógenos (McGree et al., 2001), não somente no local da infecção, mas sistemicamente, após a infecção por bactérias, vírus, fungos ou até mesmo por estresse abiótico (Scherer et al., 2005). Em arroz, foi sugerido por Song & Goodman (2001), a existência de correlação entre o aumento da expressão dos genes *PRs* e a resistência a doenças, assim como, o aumento da resistência verificado em plantas transgênicas expressando grandes quantidades de *PRs*.

Onze diferentes classes de PRs estão descritas em diversas espécies vegetais, com base nas seqüências de aminoácidos (Van Loon et al., 1994), incluindo PR-1, PR-2 (β -1,3-glucanases), PR-3 (quitinases), PR-5 (proteínas do tipo taumatina), assim como peroxidases (Yun et al., 1997). As PRs melhor caracterizadas são as β -1,3-glucanases e as quitinases. Essas enzimas hidrolíticas inibem o desenvolvimento de fungos *in vitro* pela hidrólise de substratos das paredes celulares dos fungos.

Alguns genes da classe das PRs foram identificados em arroz. Os genes *OsPR1a* (PR-1 ácida) e *OsPR1b* (PR-1 básica) foram clonados e caracterizados por Agrawal et al. (2000a e b). Os resultados revelaram que a expressão do gene *OsPR1b* é regulada pela interação de fitohormônios e luz, cujos sinais são mediados por eventos de fosforilação e desfosforilação. McGree et al. (2001) descreveram o isolamento e a caracterização do gene *PR-10* de arroz, induzido tanto após a inoculação com *M. grisea*, como pela aplicação de SA e JA.

As fitoalexinas são substâncias com ampla ação antimicrobiana e de baixo peso molecular que são sintetizadas e acumuladas na planta hospedeira para limitar o desenvolvimento do patógeno (Dixon & Harrison, 1994; Agrios, 2005). Provavelmente as fitoalexinas atuam de forma direta sobre o agressor e causam a morte do tecido infectado gerando a lesão típica de HR. Umemura et al. (2003) relataram grande quantidade de duas fitoalexinas acumuladas na HR à brusone do arroz. Plantas transgênicas de arroz, super expressando uma proteína antimicrobiana denominada defensina “wasabi”, apresentaram resistência a isolados virulentos em arroz (Kanzaki et al., 2002).

2.5. Técnicas de análise de expressão gênica diferencial

A identificação do conjunto de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo, numa determinada condição em relação à outra com a qual se deseja comparar, permite a compreensão dos fatores necessários para a manifestação do fenótipo. A habilidade em seqüenciar genomas inteiros estimulou o conhecimento da predição da função gênica das seqüências obtidas (Moody, 2001).

Para identificar e clonar genes diferencialmente expressos estão disponíveis técnicas moleculares que determinam a expressão gênica global, dentre as quais, incluem-se as baseadas em PCR para amplificação seletiva de cDNAs, como: amostragem diferencial (DDRT-PCR - Differential Display Transcritase Reversa PCR - Liang & Pardee, 1992), seqüências-alvo expressas (ESTs – Expressed Sequence Tag, Adams et al., 1995), análise representativa das diferenças (RDA - Representational Difference Analysis, Lisitsyn et al., 1993), análise serial da expressão gênica (SAGE - Serial Analysis of Gene Expression, Velculescu et al., 1995), microarranjos de DNA (“microarray”, Schena et al., 1995), uma técnica combinando cDNA com polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (cDNA-AFLP - cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms, Vos et al., 1995 e Bachem et al., 1996), e hibridização subtrativa supressiva (SSH – Supression Subtractive Hybridization, Diatchenko et al., 1996).

Através do DDRT-PCR, originalmente descrito em 1992, por Liang & Pardee, foi possível determinar uma grande parte de transcritos presentes em células de eucariotos, a partir de um único experimento e com alta

sensibilidade (Kuhn, 2001). DDRT-PCR tem sido empregado para isolar um grande número de genes de plantas que são diferencialmente expressos em resposta a estresses ambientais (Masmoudi et al., 2001) e durante etapas específicas do desenvolvimento (Walden et al., 1999).

A técnica de DDRT-PCR inclui, em ordem de aplicação, a obtenção de RNA livre de DNA, produção de cDNA pela transcrição reversa do mRNA (RT), amplificação do cDNA por PCR, e a separação e seleção visual de cDNAs amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Os fragmentos de cDNAs são recuperados do gel, reamplificados por PCR, clonados e seqüenciados (Shoham et al., 1999).

As seqüências-alvo expressas (ESTs – Expressed Sequence Tag, Adams et al., 1995) são obtidas a partir do seqüenciamento de clones de bibliotecas de cDNAs com tamanho aproximado de 300 a 500 pb. As diferenças na expressão gênica podem ser identificadas pela comparação de transcritos, que são expressos em uma biblioteca de cDNAs em relação à outra biblioteca (Moody, 2001). A identificação em larga escala de genes envolvidos nos primeiros estágios de infecção de *M. grisea* em arroz, através da obtenção de ESTs, foi realizada por Jantasuriyarat et al. (2005). Um total de 68.920 ESTs foram gerados a partir de oito bibliotecas, dentre essas, seis bibliotecas foram elaboradas utilizando mRNA isolado de tecido foliar de plantas de arroz resistente, parcialmente resistente e suscetível. Os genes de resposta de defesa, como por exemplo β -glucanase e fenil alanina amônia liase, foram induzidos tanto na biblioteca resistente como na biblioteca suscetível. Vários genes relacionados à fotossíntese foram suprimidos em ambas as bibliotecas.

Resultados similares foram obtidos por Matsumura et al. (2003), onde genes envolvidos na fotossíntese foram suprimidos em *Nicotiana benthamiana*, 1 h após a infiltração com um elicitor de *Phytophthora infestans*.

Análise representativa das diferenças (RDA) foi originalmente desenhada para identificar diferenças entre duas populações genômicas, permitindo o isolamento de seqüências presentes exclusivamente em um genoma, sendo aplicada a bactérias (Lisitsyn et al., 1993). Mais tarde, essa metodologia foi modificada para permitir a análise das diferenças entre duas populações de mRNA (Hubank & Schatz, 1994). A técnica baseia-se em ciclos sucessivos de hibridização subtrativa, seguida de PCR para o enriquecimento e o isolamento de seqüências de mRNA de expressão diferencial.

O SAGE baseia-se no princípio de que seqüências curtas de nove pares de bases são suficientes para identificar, inequivocamente, todos os transcritos expressos. Assim, os cDNAs são gerados com oligo-dt biotilado e digeridos com uma enzima que reconhece quatro pares de base. Os fragmentos correspondentes à porção 3' final dos mensageiros são capturados por estreptavidina ligada a partículas e seletivamente purificados. No sítio da enzima de restrição destas regiões é ligado um adaptador contendo um sítio para *BsmF1*, uma enzima que cliva a 12 pares de bases de sua seqüência de reconhecimento. Assim, após a digestão com essa enzima, cada mensageiro gera um único alvo de 9 pares de bases, partindo do sítio de reconhecimento da enzima que reconhece 4 pares de bases além da porção 3' do mensageiro. Os alvos são ligados entre si e seqüenciados, gerando uma tabela de freqüência de cada um deles (Velculescu et al., 1995). O SAGE permite a

análise de muitas amostras ao mesmo tempo, porém exige seqüenciamento automático em grande escala para se chegar a seqüências pouco expressas. Alterações da expressão gênica entre a interação entre *M. grisea* e arroz foram estudadas através do SAGE em células de arroz tratadas com elicitor de *M. grisea* (Matsumura et al., 2003).

O microarranjo é uma metodologia utilizada para comparar a expressão de um grande número de genes simultaneamente. Esse sistema baseia-se na impressão de milhares de clones de cDNAs em placas de vidro através de um robô e, subseqüentemente, hibridizações com duas sondas marcadas com fluorescências. As sondas são arranjos de cDNAs gerados a partir de células ou tecidos em duas situações diferentes que se deseja comparar (resistência e suscetibilidade, por exemplo). Os resultados que produzem diferentes intensidades de fluorescência são captadas por microscopia de fluorescência a laser e indicam diferentes níveis de expressão de cada gene. A imagem dos pontos fluorescentes é processada por computadores e programas específicos, sendo gerada uma grande quantidade de informações simultaneamente (Reymond, 2001). Foram desenvolvidos primeiramente em *Arabidopsis thaliana* (Schena et al., 1995) e são utilizados para estudos de mecanismos de defesa em plantas.

Uma técnica combinando cDNA com AFLP desenvolvido por Vos et al. (1995), é baseada na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição a partir de cDNA ligados a adaptadores (Bachem et al., 1996). A técnica envolve quatro passos: (1) síntese de cDNA utilizando oligonucleotídeos poli-dT, (2) digestão dos cDNAs com duas enzimas de restrição e ligação dos

adaptadores, (3) pré-amplificação com oligonucleotídeos correspondentes aos adaptadores e (4) amplificação seletiva de fragmentos de restrição com oligonucleotídeos possuindo uma ou mais bases seletivas (Bachem et al., 1998). Os produtos cDNA-AFLP são visualizados em gel de poliacrilamida.

A primeira aplicação foi relatada por Bachem et al. (1996), que analisaram a expressão diferencial em batata. Dois fragmentos de cDNAs codificantes de lipoxigenases foram isolados tendo como base a expressão diferencial de genes durante a formação do tubérculo. cDNA-AFLP também foi utilizada em alfafa e arroz para identificar a expressão diferencial de genes de tolerância e sensibilidade ao frio (Ivashuta et al., 1999).

A expressão de genes envolvidos nos eventos iniciais de resistência à *Blumeria graminis* formae speciales *hordei* (*Bgh*) em cevada (*Hordeum vulgare* L.) foi avaliada através de cDNA-AFLP. Foram identificados fragmentos derivados de transcritos (TDFs – transcript derived fragments) regulados diferencialmente entre 4 e 12 h.a.i. Determinados TDFs apresentaram homologia com MAP quinases, fatores de transcrição e receptores com domínio quinase. A análise funcional de uma MAP quinase foi realizada através do nocaute do gene codificante levando à suscetibilidade de plantas de cevada antes consideradas resistentes a *Bgh* (EckKey et al., 2004).

A técnica de SSH de cDNAs (Figura 3) oferece um método para amplificar seletivamente genes expressos diferencialmente em duas populações de mRNAs. A subtração de seqüências híbridas entre as duas populações de cDNAs ocorre através da supressão de amplificações indesejáveis, pela separação física de cDNAs de fita simples e cDNAs de fita dupla.

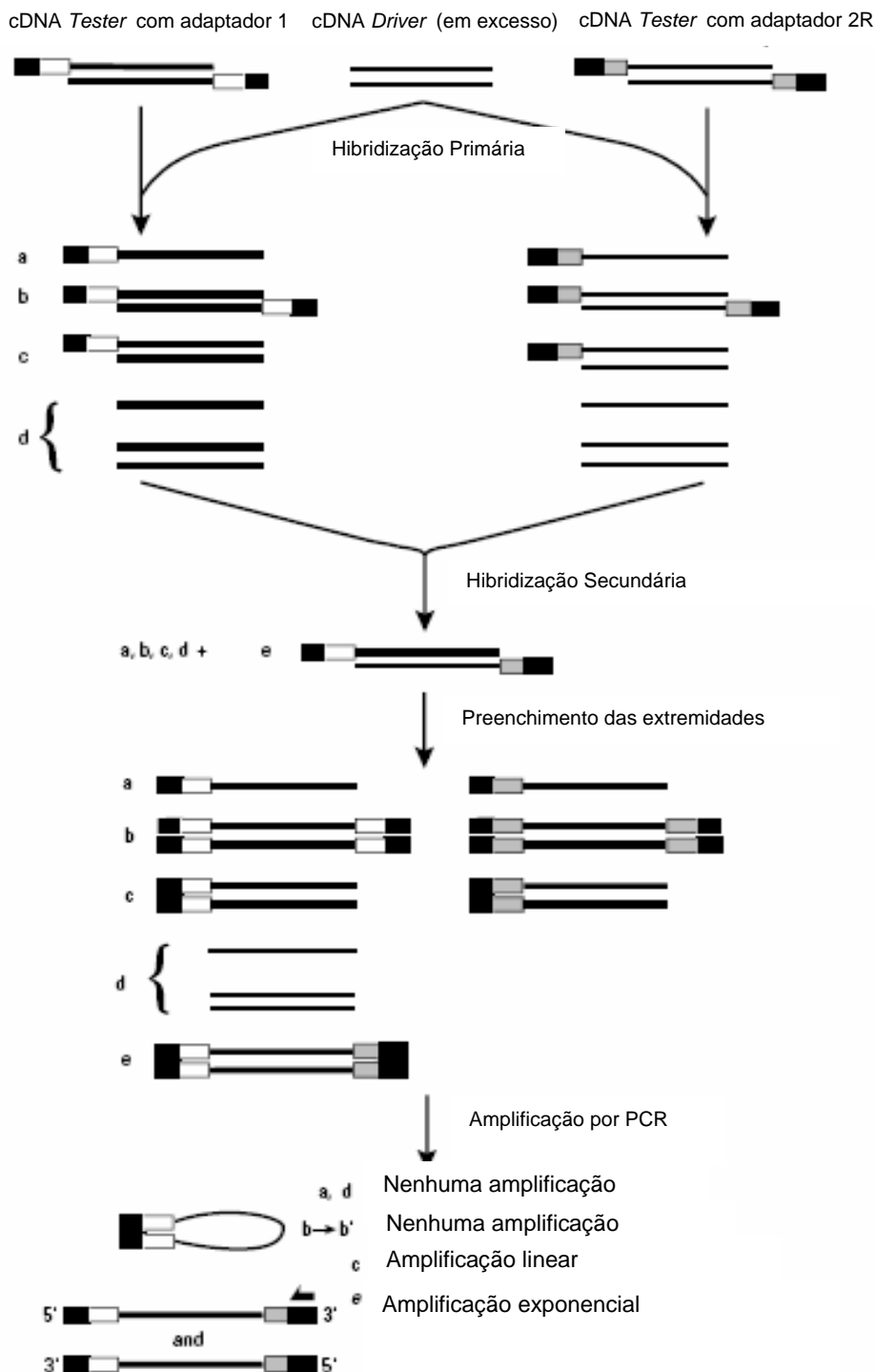


FIGURA 3. Representação diagramática da técnica de SSH. As linhas sólidas representam os cDNAs "tester" e "driver". As caixas sólidas representam a região externa dos adaptadores Ad1 e Ad2R que correspondem a seqüência do oligonucleotídeo iniciador P1. As caixas claras representam a região interna do adaptador Ad1 e a seqüência do oligonucleotídeo iniciador (NP1) e as caixas ombreadas representam a parte interna do adaptador Ad2R. Figura reproduzida de Diatchenko et al. (1996).

A técnica combina PCR supressiva com as etapas de normalização e subtração (Diatchenko et al., 1996). Ela consiste na síntese de um cDNA a partir de duas amostras de tecidos ou células contrastantes. O cDNA que se quer analisar é denominado cDNA “tester” (alvo) e o controle é o cDNA “driver”. Os cDNAs “tester” e “driver” são digeridos com uma enzima de restrição. O cDNA “tester” é subdividido em duas partes e cada parte é ligada a um diferente adaptador de fita dupla. A técnica consiste de duas hibridizações visando o enriquecimento de seqüências expressas diferentemente. Em seguida, os cDNAs expressos diferencialmente são amplificadas por PCR. Dois ciclos de amplificação também são utilizados a fim de reduzir o produto de amplificações inespecíficas. O próximo passo é a clonagem de cDNAs para identificar os mRNAs através de seqüenciamento e validar a expressão diferencial através de “northern blots” ou “reverse northern blots” (CLONTECHniques, 1995). Entre as vantagens da técnica de SSH incluem-se a detecção de genes diferencialmente expressos pouco abundantes, a supressão da amplificação de genes altamente expressos, a identificação de genes sem conhecimento prévio de suas seqüências e o uso de técnicas comuns da biologia molecular.

Essa técnica está sendo amplamente utilizada em diferentes espécies para a identificação de genes envolvidos em estresses bióticos e abióticos. Para identificar genes de defesa de espectro amplo envolvidos no processo de infecção de *M. grisea* em arroz, Lu et al. (2004) também utilizaram a técnica de SSH. Uma nova classe de genes envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz foi isolada e caracterizada em bibliotecas de cDNAs enriquecidas de

transcritos diferencialmente expressos em duas NILs, que possuem dois genes de resistência (*Pi-9* e *Pi-2*) à brusone do arroz. Quarenta e sete clones foram comparados com as seqüências de genes depositadas em bancos de genes. Entre esses, somente um deles já havia sido relatado na literatura por Xiong et al. (2001). Os 47 genes foram categorizados conforme a predição funcional em 8 diferentes grupos. Os clones agrupados na resposta de defesa apresentaram similaridade com PRs e padrão de expressão diferencial entre interações compatíveis e incompatíveis.

CAPÍTULO II

3. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE LINHAS QUASE ISOGÊNICAS E GENÓTIPOS DE ARROZ A ISOLADOS DE *Magnaporthe grisea*

3.1. INTRODUÇÃO

A principal medida de controle da brusone, causada por *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, é a utilização de cultivares resistentes. No entanto, os cultivares resistentes têm apresentado uma vida útil de dois a três anos após o seu lançamento (Zeigler et al., 1994). A explicação para essa baixa durabilidade é o emprego de genes de resistência de efeito maior nos programas de melhoramento. A resistência governada por genes de efeito maior permite às plantas reconhecerem raças específicas do patógeno e ativar as respostas de defesa. Após o reconhecimento, a defesa ocorre, freqüentemente, pela ativação da resposta de hipersensibilidade (HR - hypersensitive response), que consiste na morte rápida de um número limitado de células em torno do sítio inicial de infecção (Delaney, 1997) e na ausência da doença. Acompanhada da HR, estão o acúmulo de espécies reativas de

oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species), a ativação de genes específicos de defesa que codificam para proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs – Pathogenesis-related), a produção de enzimas hidrolíticas e a acumulação de compostos antimicrobianos (Lamb et al., 1989; Dixon & Lamb, 1990; Dangl et al., 1996; Hammond-Kosack & Jones, 1996), os quais podem estar relacionados com a resposta de resistência durável.

Existe a necessidade de identificação de genes de resistência durável à brusone do arroz e sua incorporação em cultivares em uso comercial. Em um desses estudos, Lu et al. (2004), identificaram genes de resistência de amplo espectro envolvidos no processo de infecção de *M. grisea* em arroz utilizando duas linhas quase isogênicas (NILs= Near Isogenic Lines) que possuem os genes de resistência *Pi-9* e *Pi-2*. Apesar de serem incipientes, os resultados até o momento obtidos poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz, bem como, na prospecção de novos genes de resistência de efeito menor visando à obtenção da durabilidade da resistência à brusone (Song & Goodman, 2001; Lu et al., 2004).

No ano de 1992, em um programa do IRRI na Filipinas, uma série de NILs resistentes à brusone do arroz foram desenvolvidas por Mackill & Bonman (1992). As NILs foram obtidas através da introgressão de genes de resistência de efeito maior de quatro cultivares (LAC23, 5173, Pai-Kan-Tao e Tetep) em C039, cultivar da subespécie *indica*. As NILs permitiram a identificação de novos genes de resistência: C104LLAC (*Pi-1*), C101A51 (*Pi-2*), C104PKT (*Pi-3*), C101PKT (*Pi-4^a*), C105TTP-4 (*Pi-4^b*) e IR1529 (*Pi-11*).

Em estudos realizados por Chen et al. (1996), a NIL C101A51 (*Pi-2*) foi resistente a 455 isolados coletados em diferentes regiões das Filipinas e suscetível a somente um isolado. O gene *Pi-1*, presente na NIL C104LAC, apresentou resistência de espectro amplo em um estudo populacional de *M. grisea*, realizado por Mekwatanakarn et al. (2000), com 527 isolados obtidos de cultivares de arroz em 5 locais na Tailândia. As NILs oferecem uma oportunidade única para estudos de interação gene-a-gene através de análise de expressão gênica diferencial.

O objetivo do presente trabalho foi identificar isolados de *M. grisea* que apresentassem resposta de compatibilidade e incompatibilidade em duas NILs de arroz e cinco genótipos do Programa de Melhoramento Genético do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal e isolados de *M. grisea*

O trabalho foi desenvolvido no Instituto Rio Grandense do Arroz na Estação Experimental (IRGA/EEA), Cachoeirinha/RS.

Três NILs de arroz: C104LAC que possui o gene de resistência *Pi-1*, C101A51 que possui o gene de resistência *Pi-2* e CO39 que não possui nem o gene de resistência *Pi-1* e *Pi-2*, e cinco cultivares de arroz: Oryzica Llanos 5 (cultivar com resistência durável), Fanny (cultivar suscetível) e BR-IRGA 410, IRGA 420 e IRGA 417 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do IRGA foram utilizados para o teste de resistência. Plantas dos cultivares Oryzica Llanos 5 e Fanny também foram utilizadas como controles para reações de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

Duzentas sementes de cada genótipo foram colocadas para pré-germinar em estufa a 28 °C, no escuro, em placas de Petri, onde permaneceram por cinco dias. Após esse período, dez plântulas de cada genótipo foram transferidas para copos plásticos contendo solo e foram crescidas em casa-de-vegetação por 16 h de luz a 32 °C seguido por 8 h de escuro a 17 °C. As plantas receberam aplicação de nitrogênio, correspondente a 150 Kg de N. ha⁻¹, na forma de uréia, aplicada em 3 doses iguais: 1) na semeadura; 2) uma semana após a semeadura; e 3) 14 dias após a semeadura.

Dez isolados de *M. grisea* foram utilizados para as inoculações. Os isolados de *M. grisea* pertencentes à coleção do IRGA foram obtidos de plantas de arroz coletadas em diversas lavouras e parcelas experimentais do interior

do Rio Grande do Sul entre os anos de 1996 e 2001 (João Leodato Nunes Maciel, comunicação pessoal). O isolado LFM 25 de *M. grisea* pertence à coleção do Laboratório de Fitopatologia Molecular (LFM) da UFRGS e foi obtido de plantas de arroz coletadas na região de Santa Catarina (Scheuermann, 2002). Já o isolado Py3 foi cedido pelo Dr. Anne Prabhu da EMBRAPA Arroz e Feijão. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio sólido de arroz polido (SAP) descrito por Tuite (1969), (Apêndice 1), e crescidos por 12-14 dias a 28 °C sob 12 h de luz. Após esse período, o micélio superficial foi removido com o auxílio de um pincel e lavado com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar. As placas de Petri foram cobertas com filme plástico transparente perfurado e mantidas nas mesmas condições por 4 a 6 dias, a fim de estimular a esporulação (IRRI, 1996). Foram realizadas 10 repetições para cada isolado.

3.2.2. Inoculação e coleta do material

A inoculação foi realizada em casa-de-vegetação (Figura 1-A, B, C) quando as plantas atingiram o estágio de 3-4 folhas (\pm 21 dias) (Figura 1-D), com $1,2 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ em 20 mL de uma suspensão de gelatina 0,5 % (Figura 1-E) através do processo de aspersão. A contagem da concentração de conídios foi realizada em câmara de Neubauer ou hemocitômetro. Foram realizadas 3 repetições para cada inoculação.

Quatro copos de cada NIL foram transferidos para caixas plásticas mantidas em condições de alta umidade e um fotoperíodo de 16 h de luz a 32 °C, seguido por 8 h a 17 °C para a inoculação com os isolados LFM 25; IRGA

193.1.1.; IRGA 182.1.1.; IRGA 177.1.1.; Py3; IRGA 79.1.1.; IRGA 066.2.1. e IRGA 126.2.1. de *M. grisea*. Quatro copos de cada cultivar foram transferidos para caixas plásticas e mantidos sob as mesmas condições e inoculados com os isolados IRGA 85.1.1. e IRGA 50.1.1. de *M. grisea*. Além disso, 2 copos de Oryzica Llanos 5 (controle positivo) e Fanny (controle negativo) foram utilizados nas inoculações em cada caixa plástica.

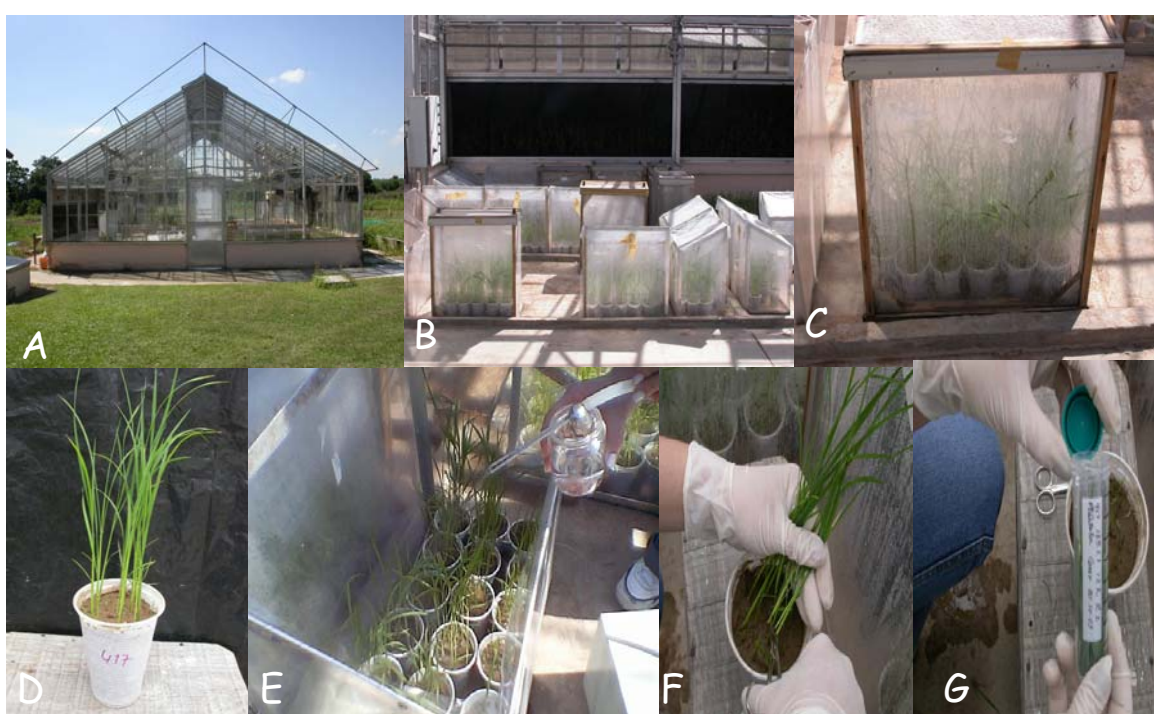


FIGURA 1. A) Casa-de-vegetação. B e C) Visão geral das caixas plásticas para inoculações. D) Planta de arroz a ser inoculada. E) Inoculações. F e G) Coleta do material para extração de RNA. IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003.

Em cada tratamento, 2 copos foram utilizados para o teste de resistência e 2 copos foram utilizados para a coleta de folhas (Figura 1-F e G).

3.2.3. Teste de resistência

As reações dos genótipos aos isolados foram avaliadas aos 14 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática com notas de 0-9 descritas na Tabela 1 conforme IRRI (International Rice Research Institute) 1996.

TABELA 1. Escala de notas utilizadas para avaliar a resistência dos isolados

Notas	Sintomatologias	Reações
0	Nenhuma lesão observada	Resistente
1	Pequenas ou grandes lesões marrons sem centro esporulativo	Resistente
2	Pequenas lesões arredondadas ou ligeiramente alongadas, pontos necróticos acinzentados com cerca de 1-2 mm de diâmetro, com borda marrom. Lesões mais freqüentes nas folhas inferiores	Resistente
3	O tipo de lesão é o mesmo da escala 2, no entanto com um número significativo de lesões nas folhas superiores	Resistente
4	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone, com 3 mm ou mais, cobrindo menos que 4% da área foliar	Suscetível
5	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone cobrindo 4 a 10% da área foliar	Suscetível
6	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone cobrindo 11 a 25% da área foliar	Suscetível
7	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone cobrindo 26 a 50% da área foliar	Suscetível
8	Lesões típicas de suscetibilidade à brusone cobrindo 51 a 75% da área foliar e a ocorrência de muitas folhas mortas	Suscetível
9	Mais que 75% da área foliar afetada	Suscetível

IRRI, 1996.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Análise da resistência

Foram verificadas diferenças em relação à resistência das NILs aos isolados inoculados de *M. grisea*. Os isolados IRGA 193.1.1. e LFM 25 foram os únicos que apresentaram uma resposta esperada para o modelo biológico gene-a-gene proposto por Flor em 1942, considera a existência de interações de compatibilidade e incompatibilidade entre as NILs C104LAC e C101A51 e os isolados citados (Tabela 2).

TABELA 2. Reações à brusone nas linhas quase-isogênicas de arroz (NILs), Oryzica Llanos 5 e Fanny à inoculação com oito isolados de *M. grisea*. IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003

Isolados	NILs			Genótipos	
	C101A51	C104LAC	C039	Oryzica Llanos5	Fanny
IRGA 193.1.1.	R* (0)**	S* (4)	S (5)	R (0)	S (4)
LFM 25	S (4)	R (2)	S (5)	R (0)	S (5)
IRGA 182.1.1.	S (4)	S (6)	S (5)	R (0)	S (5)
IRGA 177.1.1.	S (5)	S (4)	S (7)	R (0)	S (9)
Py3	R (1)	R (2)	S (7)	R (0)	S (9)
IRGA 79.1.1.	S (5)	S (5)	S (8)	R (0)	S (8)
IRGA 066.2.1.	S (4)	S (7)	S (6)	R (0)	S (8)
IRGA 126.2.1.	S (4)	S (6)	S (6)	R (0)	S (5)
H ₂ O	-	-	-	-	-

*R= resistentes e *S= suscetibilidade, ** Notas= média de 10 plantas.

No ano de 1992, em um programa do IRRI na Filipinas, uma série de NILs resistentes à brusone do arroz foram desenvolvidas por Mackill & Bonman (1992). Essas NILs são genótipos quase idênticos, exceto pela presença de um

gene de resistência de efeito maior (*R*). As NILs foram obtidas através da introgressão de genes de resistência de efeito maior de quatro cultivares (LAC23, 5173, Pai-Kan-Tao e Tetep) em C039, cultivar da subespécie *indica*. Cada NIL possui um ou dois genes de resistência de efeito maior. As NILs permitiram a identificação de novos genes de resistência: C104LLAC (*Pi-1*), C101A51 (*Pi-2*), C104PKT (*Pi-3*), C101PKT (*Pi-4^a*), C105TTP-4 (*Pi-4^b*) e IR1529 (*Pi-11*).

Zeigler et al. (1995) identificaram um espectro amplo de resistência na NIL C101A51, que possui o gene de resistência *Pi-2*, em estudos realizados nas Filipinas. Dos 234 isolados, os quais foram agrupados em 6 linhagens, a NIL C101A51 apresentou suscetibilidade somente à linhagem 44. Em outro estudo, esse mesmo genótipo foi suscetível somente a um isolado em uma análise de 455 isolados coletados em diferentes regiões das Filipinas. Estes testes foram realizados sob condições controladas e os 455 isolados representaram, no mínimo, 18 linhagens de *M. grisea*. Extensivos testes em campo conduzidos em 16 países também indicaram que o gene *Pi-2* é responsável pela durabilidade da resistência (Chen et al., 1996). Assim, o gene *Pi-2* pode ser útil para a obtenção de resistência à brusone do arroz.

O gene *Pi-2* está localizado no cromossomo 6 do arroz (Jiang & Wang, 2002) e a análise da região que contém o gene revelou a presença de seqüências com homologia a quinases, proteínas de ligação ao DNA e fatores de transcrição. Esses resultados são úteis para a seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético e também podem facilitar a clonagem do gene *Pi-2*.

O gene *Pi-1*, presente na NIL C104LAC, apresentou resistência de espectro amplo em um estudo populacional de *M. grisea*, realizado por Mekwatanakarn et al. (2000), com 527 isolados obtidos de cultivares de arroz em 5 locais na Tailândia. Entretanto, no RS a ocorrência de isolados que causam compatibilidade com a NILC104LAC foi verificada por Maciel et al. (2004). Dos 51 isolados avaliados, 36 apresentaram resposta de compatibilidade com a NIL C104LAC.

Foram realizadas três repetições com os isolados IRGA 193.1.1. e LFM 25 a fim de verificar a validade do modelo biológico e não foram constatadas diferenças em relação aos resultados entre as inoculações, conforme Tabela 3.

TABELA 3. Reação à brusone nas linhas quase-isogênicas de arroz (NILs) e nos tratamentos controles quando submetidos a inoculações com dois isolados de *M. grisea*. IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003 e 2004

Isolados	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
	IRGA 193.1.1.	LFM 25	IRGA 193.1.1.	LFM 25	IRGA 193.1.1.	LFM 25
NILs						
C101A51	R* (0)**	S* (4)	R (0)	S (4)	R (0)	S (4)
C104LAC	S (4)	R (2)	S (4)	R (2)	S (4)	R (2)
C039	S (5)	S (5)	S (5)	S (5)	S (5)	S (5)
Oryzica	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)
Llanos5						
Fanny	S (4)	S (5)	S (4)	S (5)	S (4)	S (5)
H ₂ O	-	-	-	-	-	-

*R= resistentes e *S= suscetibilidade, ** Notas= média de 10 plantas.

Os genótipos selecionados BR-IRGA 410, IRGA 417 e IRGA 420 foram utilizados por serem genótipos elite do programa de melhoramento genético do IRGA e por serem distintos entre si em relação à resistência à brusone com os isolados avaliados.

Foram realizadas três repetições com os isolados IRGA 50.1.1. e IRGA 185.1.1. e não foram constatadas diferenças entre os cultivares e os isolados avaliados quanto à virulência de *M. grisea* (Tabela 4).

TABELA 4. Reação à brusone nas cultivares de arroz quando submetidas a inoculações com dois isolados de *M. grisea*. IRGA/EEA, Cachoeirinha, RS, 2003

Cultivares	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
	Isolados IRGA 185.1.1.	IRGA 50.1.1.	IRGA 185.1.1.	IRGA 50.1.1.	IRGA 185.1.1.	IRGA 50.1.1.
BR-IRGA 410	S* (4)**	S (6)	S (4)	S (6)	S (4)	S (6)
IRGA 417	R* (2)	R (1)	R (2)	R (1)	R (2)	R (1)
IRGA 420	R (0)	R (1)	R (0)	R (1)	R (0)	R (1)
Oryzica Llanos 5	R (0)	R (1)	R (0)	R (1)	R (0)	R (1)
Fanny	S (6)	S (7)	S (6)	S (7)	S (6)	S (7)
H ₂ O	-	-	-	-	-	-

* S= suscetibilidade e R= resistentes, ** Notas= média de 10 plantas.

Oryzica Llanos 5 possui resistência durável à brusone, mesmo sendo cultivado em uma área de 300.000 ha por mais de 10 anos. Esse cultivar foi resistente a todos os isolados testados e é considerado um bom modelo para estudar mecanismos de resistência. Já o cultivar Fanny foi altamente suscetível à maioria dos isolados do patógeno (Tabelas 2, 3 e 4). A análise da expressão diferencial dos genes de resistência de amplo espectro através da análise em um macroarranjo de cDNAs fixados em membrana (“reverse northern blot”) com os cultivares Oryzica Llanos 5 e Fanny poderá auxiliar na identificação de genes de expressão diferencial envolvidos na resistência de amplo espectro à brusone do arroz.

CAPÍTULO III

4. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE *Magnaporthe grisea* E ARROZ ATRAVÉS DA TÉCNICA DE cDNA-AFLP

4.1. INTRODUÇÃO

A habilidade de uma planta em reconhecer um patógeno avirulento e induzir resposta de defesa é, na maioria das vezes, iniciada através da interação entre a proteína codificada pelo gene de resistência (*R*) e a proteína codificada pelo gene de avirulência (*Avr*) do patógeno (Flor, 1942). Uma das mais visíveis respostas de defesa das plantas proveniente da interação é a resposta de hipersensibilidade (HR), uma forma de morte celular programada que leva à formação de lesões necróticas no local da infecção (Dangl et al., 1996).

Outros fenômenos associados à HR são a cascata de transdução de sinais e a ativação de genes relacionados à defesa proporcionando o fluxo de íons, o aumento da atividade de espécies de oxigênios reativos (ROS), a acumulação de ácido salicílico e a ativação de genes relacionados à patogênese (PRs) (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Dempsey et al., 1999).

Subseqüente a esses eventos, a planta desenvolve uma resistência de espectro amplo, distante do local de penetração do patógeno, conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR).

A SAR foi demonstrada em várias interações planta-patógeno levando à proteção de espectro amplo e de maior duração, sendo efetiva contra doenças causadas por vírus, fungos e bactérias (Ryals et al., 1996; Herms et al., 2002).

Nos últimos anos, um número significativo de técnicas foi desenvolvido para estudos da análise de expressão diferencial de genes. Tais técnicas permitem a elucidação de mecanismos celulares complexos através da detecção de mudanças globais no padrão de expressão do mRNA, dispensando o conhecimento prévio dos genes envolvidos. Entre essas técnicas podem ser citadas a amostragem diferencial (DDRT-PCR - Differential Display Transcritase Reversa PCR - Liang & Pardee, 1992), seqüências-alvo expressas (ESTs – Expressed Sequence Tag, Adams et al., 1995), análise representativa das diferenças (RDA - Representational Difference Analysis, Lisitsyn et al., 1993), análise serial da expressão gênica (SAGE - Serial Analysis of Gene Expression, Velculescu et al., 1995), microarranjos de DNA (“microarray”, Schena et al., 1995), hibridização subtrativa supressiva (SSH – Supression Subtractive Hybridization, Diatchenko et al., 1996) e polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados de cDNAs (cDNA-AFLP - cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms, Vos et al., 1995; Bachem et al., 1996).

A técnica de cDNA-AFLP é considerada útil para o isolamento de genes diferencialmente expressos. A primeira aplicação foi relatada por Bachem et al.

(1996) que analisaram a expressão diferencial em batata. Trinta e quatro genes diferencialmente expressos foram identificados por Mao et al. (2004) em plantas de arroz submetidas ao tratamento com alumínio possibilitando o entendimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade e tolerância a este metal em arroz. Através da técnica de cDNA-AFLP, Zheng et al. (2004) identificaram genes relacionados à resistência à brusone em arroz envolvidos na transdução de sinais.

A expressão coordenada de genes relacionados à resistência foi verificada por Ganesan & Thomas (2001) em resposta a fatores bióticos e abióticos. Foi avaliada a acumulação de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) em folhas de arroz após o tratamento com SA (ácido salicílico). A inoculação de folhas de arroz com isolados de *M. grisea* também levou à produção de H_2O_2 . Um aumento na atividade da glutathione redutase (GR), uma enzima que degrada superóxido, foi observada após o tratamento de SA e acumulação de ROS. O tratamento com SA induziu a ativação da transcrição do elemento as-1, envolvido nos mecanismos de defesa contra estresse oxidativo e a resposta de HR. A expressão de *PR5*, o qual está associado com a SAR, foi observada após o tratamento com SA.

Alguns genes da classe das PRs foram identificados em arroz. Agrawal et al. (2000a e b) clonaram e caracterizaram os genes *OsPR1a* (PR-1 ácida) e *OsPR1b* (PR-1 básica), respectivamente. Os resultados revelaram que a expressão do gene *OsPR1b* é regulada pela interação de fitohormônios e luz, cujos sinais são mediados por eventos de fosforilação e desfosforilação.

O presente estudo estabelece como premissa que os genes envolvidos na resistência à *M. grisea* em arroz são coordenadamente expressos em distintas interações incompatíveis. O objetivo deste estudo foi identificar genes envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz através da obtenção e caracterização de um banco de cDNAs utilizando a técnica de cDNA-AFLP.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal e isolados de *M. grisea*

Três linhas quase isogênicas (NILs= Near Isogenic Lines) de arroz: C104LAC que possui o gene de resistência *Pi-1*, C101A51 que possui o gene de resistência *Pi-2* e CO39 que não possui nem os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-2* e os isolados de *M. grisea* IRGA 193.1.1. e LFM 25 foram utilizados, totalizando 18 tratamentos, descritos na Tabela 1.

TABELA 1. NILs de arroz, isolados de *M. grisea* e períodos de coleta do material vegetal horas após a inoculação (h.a.i.) utilizados na técnica de cDNA-AFLP. IRGA/ EEA, Cachoeirinha, RS, 2003

Tratamentos	Identificações	NILs de arroz	Isolados de <i>M. grisea</i>	Coleta do material (h.a.i)	Fenótipos
1	1S1a*	C101A51	LFM 25	72	Suscetível
2	1R2a	C101A51	IRGA193.1.1.	72	Resistente
3	1C3a	C101A51	**	72	Controle
4	2R1a	C104LAC	LFM 25	72	Resistente
5	2S2a	C104LAC	IRGA193.1.1.	72	Suscetível
6	2C3a	C104LAC	**	72	Controle
7	3S1a	C039	LFM 25	72	Suscetível
8	3S2a	C039	IRGA193.1.1.	72	Suscetível
9	3C3a	C039	**	72	Controle
10	1S1b	C101A51	LFM 25	120	Suscetível
11	1R2b	C101A51	IRGA193.1.1.	120	Resistente
12	1C3b	C101A51	**	120	Controle
13	2R1b	C104LAC	LFM 25	120	Resistente
14	2S2b	C104LAC	IRGA193.1.1.	120	Suscetível
15	2C3b	C104LAC	**	120	Controle
16	3S1b	C039	LFM 25	120	Suscetível
17	3S2b	C039	IRGA193.1.1.	120	Suscetível
18	3C3b	C039	**	120	Controle

*As legendas das figuras e dos géis, os resultados e discussão serão citados com as seguintes abreviaturas: 1= C101A51, 2= C104LAC23 e 3= CO39; R= resistente, S= suscetível e C= controle; 1= LFM 25, 2= IRGA 193.1.1. e 3= tratamento com água; a= 72 h.a.i. e b= 120 h.a.i. ** Controle tratado com água.

O material vegetal, os isolados e as inoculações foram obtidos conforme descrito no Capítulo II (Itens 3.2.1. e 3.2.2.).

4.2.2. Extração de RNA, isolamento de mRNA e síntese de cDNAs

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Molecular (LFM) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS. O RNA total foi extraído conforme Bugos et al. (1995). O tecido foliar (100 a 200 mg) foi triturado utilizando nitrogênio líquido. Foram acrescentados 400 μ L de tampão de extração de RNA [100 mM de Tris-HCl (pH 9,0); 200 mM de NaCl; 15 mM de EDTA; e 0,5 % de SDS], 2,3 μ L de 2-mercaptoetanol, 400 μ L de fenol e 80 μ L de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a homogeneização em um agitador tipo vórtex por 2 min, foram acrescentados 28 μ L de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). Nova agitação vigorosa foi realizada por 1 min, seguida de uma incubação no gelo por 15 min. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C. Ao líquido sobrenadante foram acrescentados 400 μ L de fenol e 80 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v), seguida de agitação vigorosa por 2 min e centrifugação a 16.000 x g por 5 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido com o líquido sobrenadante obtido após a centrifugação. Após as extrações, os ácidos nucleicos foram precipitados através da adição de 500 μ L de isopropanol e da incubação por aproximadamente 1 h a -20 °C e, em seguida, centrifugados a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 μ L de etanol 70 % ao precipitado, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi

descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após, o precipitado foi ressuspenso em 82,5 µL de água ultra pura (Milli-Q) e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A precipitação seletiva de RNA foi realizada com a adição de 37,5 µL de cloreto de lítio 8 M e da incubação no gelo durante 3 h, seguida de centrifugação a 10.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante contendo o DNA foi retirado e a lavagem do precipitado foi realizada com 500 µL de etanol 70 % seguida de centrifugação a 10.000 x *g* por 5 min a 4 °C. Esse último procedimento foi repetido mais uma vez. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuspenso em 50 µL de água ultra pura. O RNA foi incubado por 10 min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à - 20 °C.

A concentração de RNA total foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (BioRad) pela absorbância a 260 nm (nanômetros) (A_{260}), utilizando como padrão 1 ($A_{260}= 1$ equivale a uma concentração de 40 µg.mL⁻¹ de RNA). A qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria pela relação OD₂₆₀/280 nm e por eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1 %, contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H₃BO₃ e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 100 pb DNA (Invitrogen).

Os mRNAs das amostras foram obtidos utilizando o RNA total extraído e o sistema “PolyAtract® mRNA Isolation System III” (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Para a síntese do cDNA de fita simples (ss cDNA), os mRNAs foram submetidos à reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), conforme descrito por Murphy & Taiz (1995). O mRNA das plantas (1 µg) foi transcrito reversamente (RT) adicionando primeiro 0,4 µM do oligonucleotídeo iniciador OLIGO1 (5'- AAG CTT TTT TTT TTT C -3') e água ultra pura até completar o volume de 25 µL. A reação foi incubada por 2 min a 70 °C. Posteriormente, a reação foi constituída de 0,5 mM de cada dNTP [(dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen)]; 50 mM de Tris HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 3 mM MgCl₂; 1 mM de DTT (ditiotretitol); 200 U da enzima transcrição reversa (MMLV-RT) (Amersham Biosciences) e água ultra pura até completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada por 2 h a 37 °C. Seguindo o procedimento, foi adicionada a cauda poliA através da reação contendo os 50 µL da RT-PCR. A reação foi constituída de 100 mM cacodilato de sódio (pH 7,2); 2 mM de CoCl₂; 0,2 mM de 2-Mercaptoetanol; 0,2 mM de dATP; 6,5 U da enzima Terminal Deoxinucleotídeo Transferase (TdT) (Amersham Biosciences) e água ultra pura até completar o volume de 100 µL. A reação foi incubada por 1 h a 37 °C e a enzima TdT foi inativada por 2 min a 65 °C.

Para a síntese definitiva do cDNA de fita dupla (ds cDNA), a reação foi composta de 3 µL do ss cDNA; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µM do oligonucleotídeo iniciador NOT1 (5'- CGC GCC GCT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'); 5 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 100 µL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 17 ciclos

constituídos de desnaturação a 95 °C por 15 s, pareamento a 40 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 6 min. Os ds cDNAs foram purificados através do sistema “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), conforme instruções do fabricante.

4.2.3. Digestão dos ds cDNA

Os ds cDNAs foram digeridos com duas enzimas de restrição: *EcoR* I, que reconhece uma seqüência de seis pares de bases (5'-G↓AATTC-3') e *Mse* I, que reconhece uma seqüência de quatro pares de bases (5'-T↓TAA-3'). A reação de digestão foi constituída de 50 mM de Tris HCl (pH 8,0); 50 mM de NaCl; 10 mM de MgCl₂; 2,5 U de *EcoR* I; 2,5 U de *Mse* I e água ultra pura até completar o volume de 25 µL. A reação de digestão foi realizada por 2 h a 37 °C e em seguida incubada por 15 min a 70 °C para a inativação das enzimas.

4.2.4. Pareamento e ligação de adaptadores específicos

Antes da ligação dos adaptadores foi realizada a reação de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores de fita simples. A reação foi constituída de 20 µM de cada oligonucleotídeo iniciador de fita simples e água ultra pura até completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research), por 5 min a 95 °C seguido de incubação até a temperatura atingir 20 °C. O adaptador E foi formado através do pareamento dos oligonucleotídeos de fita simples E-A1 e E-A2, o adaptador M com o pareamento dos oligonucleotídeos de fita simples M-A1 e M-A2 (Tabela 2).

A reação de ligação foi constituída dos 25 μ L dos ds cDNA obtidos no item 4.2.3; 50 mM de Tris-HCl (pH 7,6); 5 mM de $MgCl_2$; 1 mM de ATP; 5 % (p/v) de polietileno glicérol 8000; 1,6 μ M do adaptador M; 0,16 μ M do adaptador E; 1 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 50 μ L. A reação foi incubada por 2 h a 20 °C. Os ds cDNAs foram diluídos 10 vezes para utilização posterior. As seqüências dos adaptadores e oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações foram baseadas nas recomendações do sistema “AFLPTM Analysis System I e AFLPTM Start Primer” (Gibco BRL).

4.2.5. Pré-amplificação dos fragmentos de ds cDNAs

Os fragmentos de ds cDNA foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores sem nenhuma base seletiva (E-0 e M-0) (Tabela 2). A PCR foi constituída de 200 μ M de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 1,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 25 μ L. A reação foi incubada no termociclador PTC-100TM (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 30 s, pareamento a 56 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, constituindo um total de 20 ciclos. Os ds cDNAs pré-amplificados foram diluídos 50 vezes e utilizados para a reação de amplificação seletiva.

4.2.6. Amplificação seletiva dos fragmentos de ds cDNAs-AFLP

A reação de amplificação seletiva foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos com uma base seletiva (Tabela 2).

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de cDNA-AFLP. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2003

Nome	Seqüência (5'—3')
Adaptador E-A1*	CTCGTAGACTGCGTACC
Adaptador E-A2	AATTGGTACGCAGTC
Adaptador M-A1**	GACGATGAGTCCTGAG
Adaptador M-A2	TACTCAGGACTCAT
E-0	GTAGACTGCGTACCAATTC
M-0	GACGATGAGTCCTGAGTAA
E-A	GTAGACTGCGTACCAATTCA
E-T	GTAGACTGCGTACCAATTCT
E-C	GTAGACTGCGTACCAATTCC
E-G	GTAGACTGCGTACCAATTCG
M-A	GACGATGAGTCCTGAGTAAA
M-T	GACGATGAGTCCTGAGTAAT
M-C	GACGATGAGTCCTGAGTAAC
M-G	GACGATGAGTCCTGAGTAAG

* Adaptador baseado no sítio de restrição da enzima *EcoR* I.

** Adaptador baseado no sítio de restrição da enzima *Mse* I.

A reação foi constituída de 20 mM Tris-HCl, (pH 8,4); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 1,0 µM do oligonucleotídeo iniciador E-X; 2,1 µM do oligonucleotídeo iniciador M-X; 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 20 µL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 30 s, pareamento a 65 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min, totalizando 13 ciclos, sendo que, a cada ciclo ocorreu a

diminuição de 0,7 °C na temperatura de pareamento. Após os 13 ciclos foram executados mais 24 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 56 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min.

4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos amplificados obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6 % [0,8 M de acrilamida, 19,46 mM de N,N'-Metilenebisacrilamida, 7 M de uréia, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, 4,4 mM de persulfato de amônio e 3,9 mM de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED)]. A eletroforese foi realizada no sistema de seqüenciamento Hoefer™ SQ3 (Pharmacia Biosciences). As condições da eletroforese foram de 50 Watts por aproximadamente 5 h a 45-50°C. Previamente ao início da eletroforese as amostras foram incubadas por 5 min a 95 °C juntamente com o tampão de amostra (98 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,03 % de azul de bromofenol e 0,33 % de Xylene C) com uma proporção de amostra para tampão de 1:1 (v:v).

Para os sistemas de coloração e revelação, foram utilizados nitrato de prata e carbonato de sódio anidro, respectivamente, conforme protocolo Silver Sequence™. A placa contendo o gel foi imersa em ácido acético 10 % e incubada por 20 min. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com água destilada por 2 min seguidas de imersão do gel em solução de coloração de 6 mM de AgNO₃ e 0,055 % de formaldeído durante 30 min, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Após a lavagem durante 21 s com água destilada, a coloração foi revelada com a imersão da placa em solução

resfriada (10 °C) de 0,28 M de Na₂CO₃; 0,055 % de formaldeído e 1,2 µM de tiosulfato de sódio, sob agitação constante. A reação foi interrompida pela adição de 10 % de ácido acético glacial. O gel foi fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 250 pb DNA (Invitrogen).

4.2.8. Isolamento e re-amplificação dos cDNAs-AFLP

Os fragmentos cDNAs-AFLP diferencialmente expressos foram isolados do gel de poliacrilamida com o auxílio de uma ponteira descartável. Foram coletados em torno de três círculos de cada fragmento e transferidos para tubos de reação de 1,5 mL. A seguir foram adicionados 200 µL de água ultra pura e incubados por 15 min à temperatura ambiente. Uma gota de óleo mineral foi acrescentada a cada tubo de reação. Os tubos de reação permaneceram em banho-maria por 10 min a 100 °C e após foram centrifugados a 10.000 x g por 1 min. Uma alíquota de 10 µL da solução (sem óleo) foi transferida para um tubo de reação de 200 µL. Os cDNAs eluídos foram submetidos a duas re-amplificações subseqüentes através da PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores e condições da amplificação seletiva, exceto para a concentração de MgCl₂, que foi de 3,0 mM e 1,5 mM na primeira e segunda reações, respectivamente. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0 %, conforme item 4.2.2 (dados não apresentados).

Os fragmentos cDNA-AFLP re-amplificados foram purificados com as enzimas ExoSAP-IT® (usb®), pela incubação a 37 °C por 15 min, seguido de 80 °C por 15 min, conforme orientações do fornecedor.

4.2.9. Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR e 0,25 µM do oligonucleotídeo iniciador E-0 e seguindo as instruções do fornecedor.

4.2.10. Análise da similaridade das seqüências

Os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd). Após foi realizada a comparação das seqüências obtidas com as seqüências de nucleotídeos (BLASTn) e proteínas (BLASTx) depositadas no GenBank: National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), através do programa BLAST [(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul et al., 1997)]. A categorização funcional foi realizada com o programa European Bioinformatics Institute (EBI) e European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Identificação de genes envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz

O RNA total extraído das plantas coletadas utilizado para a técnica de cDNA-AFLP apresentou concentrações entre 0,8 mg/mL e 2,2 mg/mL. A qualidade dos RNAs extraídos, estimada pela relação das leituras de OD260/280, ficou entre 1,8 a 2,0 (Figura 1).

Os fragmentos de cDNAs foram amplificados utilizando 11 combinações de oligonucleotídeos iniciadores seletivos (Tabela 3). Um total de 6.568 fragmentos de cDNA-AFLP foram identificados em géis de poliacrilamida, com tamanhos que variaram entre 200 e 1.600 pb. Cada uma das combinações apresentou no mínimo 30 e no máximo 109 fragmentos, incluindo os monomórficos e os polimórficos. A Figura 2 apresenta um exemplo dos perfis de expressão obtidos.

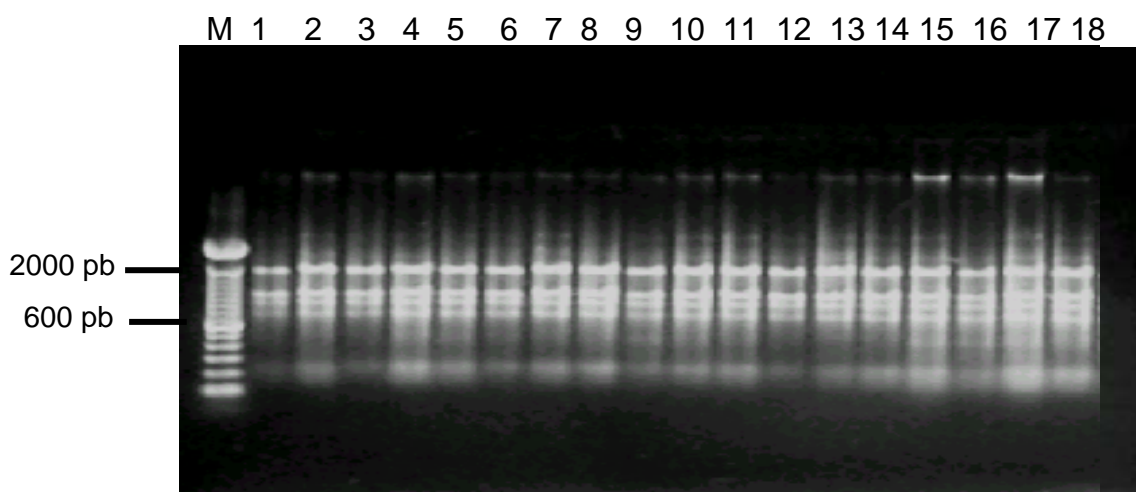


FIGURA 1. Perfis eletroforéticos do RNA total extraído de plantas de arroz. M - Marcador de 100 pb DNA. Os números identificados em cada amostra do gel representam os 18 tratamentos. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2003.

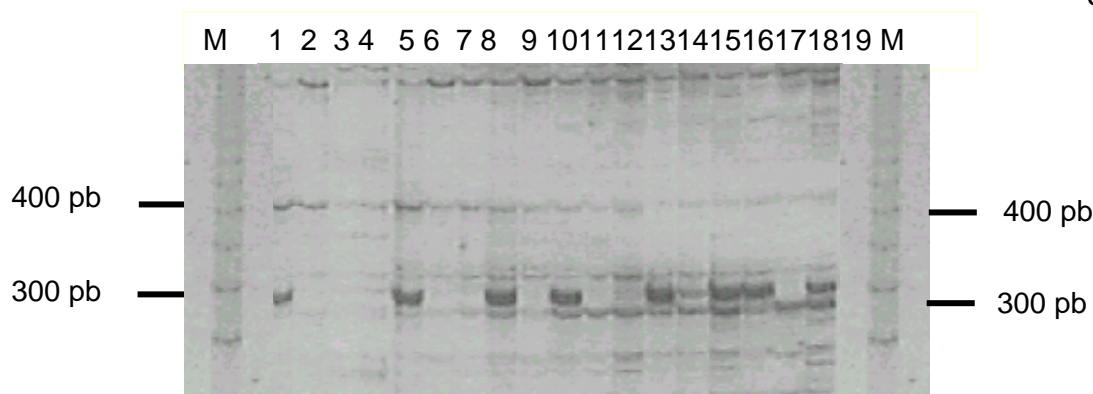


FIGURA 2. Perfis eletroforéticos dos fragmentos de cDNA-AFLP separados em gel de poliacrilamida. M - Marcador de 50 pb DNA. Os números identificados em cada amostra do gel representam os 18 tratamentos descritos na Tabela 1. Os fragmentos, que possuem os quadrados, são os diferencialmente expressos. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2003.

4.3.2. Análise dos fragmentos re-amplificados

Foram selecionados 635 fragmentos, 237 foram monomórficos e 398 foram polimórficos (Tabela 3).

TABELA 3. Combinações de oligonucleotídeos iniciadores, número total de fragmentos identificados, monomórficos, polimórficos e re-amplificados obtidos através da técnica de cDNA-AFLP. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2003

Combinações dos Oligonucleotídeos Iniciadores	Número total de fragmentos	Número de fragmentos monomórficos	Número de fragmentos Polimórficos	Número de fragmentos coletados	Número de fragmentos re-amplificados
A= EA X MA	109	29	80	65	38
B= EA X MT	88	20	68	54	20
D= EA X MG	43	16	27	31	26
E= ET X MT	30	20	10	75	18
F= EA X MG	21	9	12	45	21
G= ET X MA	62	37	25	43	22
I= ET X MC	71	19	52	85	41
J= EC X MC	30	20	10	54	18
M= EC X MT	77	35	42	43	39
N= EG X MG	66	13	53	63	21
P= EG X MA	38	19	19	68	22
TOTAL	635	237	398	572	286

Quinhentos e setenta dois fragmentos foram eluídos e submetidos à re-amplificação. Amostras de fragmentos polimórficos (23) e monomórficos (2) que apresentaram a presença de fragmentos únicos resultaram em seqüenciamento de boa qualidade.

Duas re-amplificações foram realizadas para isolar os fragmentos a partir do gel de poliacrilamida. Após a primeira PCR, os fragmentos amplificados não foram visíveis após verificação em gel de agarose. Os fragmentos isolados do gel de poliacrilamida podem ter sofrido a ação do EDTA, que quelata íons como o Mg^{++} , inibindo a atividade enzimática da polimerase, as quais são magnésio dependentes (Sambrook et al., 1989). Após a segunda PCR, 286 fragmentos amplificaram, sendo que em 261 foi verificado mais do que um fragmento.

No presente trabalho foi utilizado somente um nucleotídeo seletivo. Durrant et al. (2000) utilizando cDNA-AFLP em tomate, consideraram como causas prováveis para a presença de mais de uma seqüência a co-migração de fragmentos e a utilização de apenas um nucleotídeo seletivo na amplificação seletiva. Em outro trabalho, Bruggmann et al. (2005), através da análise da expressão diferencial de genes presentes em folhas de trigo identificaram mais do que uma seqüência na mesma amostra, indicando a presença de mistura de DNA no produto de PCR. Em *Arabidopsis thaliana*, 119 fragmentos cDNA-AFLP foram obtidos e 23 % apresentaram a co-migração de fragmentos (Vuylsteke et al., 2006).

4.3.3. Análise da similaridade das seqüências

A comparação das seqüências dos 30 fragmentos diferencialmente expressos de cDNA-AFLP com as depositadas no NCBI permitiu identificar cinco categorias funcionais: proteínas relacionadas aos processos de recombinação e reparo de DNA, fatores de transcrição, transporte de lipídios, ubiquitinação e transdução de sinais. Um outro grupo de fragmentos apresentou similaridade com proteínas hipotéticas (6), com função desconhecida (11) e sem similaridade (2). Resultados similares foram encontrados por Durrant et al. (2000) e Simões-Araújo et al. (2002). As seqüências que não apresentaram similaridade podem representar genes ainda não caracterizados. A maioria das seqüências apresentou o valor de E alto e escore baixo, exceto o fragmento diferencialmente expresso no cDNA 1R2b obtido da NIL C101A51 quando inoculada com o isolado IRGA 193.1.1. a 120 h.a.i. (Tabela 4). Os resultados obtidos com o valor de E Blast não significativo, para a maioria dos fragmentos de cDNA-AFLP, podem estar relacionados à qualidade das seqüências obtidas a partir do seqüenciamento direto.

Oito fragmentos diferencialmente expressos foram identificados na interação entre a NIL C104LAC quando inoculada com o isolado LFM 25, 72 h.a.i., 4 fragmentos diferencialmente expressos na interação entre a NIL C101A51 e o isolado IRGA 193.1.1., 120 h.a.i., 4 apresentaram expressão constitutiva e 1 expressão induzida, somente 72 h.a.i.

TABELA 4. Análise da similaridade dos clones seqüenciados e isolados na técnica de cDNA-AFLP na interação entre *M. grisea* e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004

cDNAs	Identificações	Categorias	Descrição da seqüência (Espécie)	Acesso	R	S	Escore	E Blast	I*** (%)
2R1a	A15a	Recombinação e reparo de DNA	Proteína MGC 81443 (<i>Xenopus laevis</i>)	AAH71127.1	+		31,6	9,5	29
**	B79i	Recombinação de DNA	Proteína do retrotransposon Ty3-gypsy (<i>Oryza sativa</i>)	ABA93876.1	+	+	31,6	9,3	29
1R2b	A17b	Fator de transcrição	Possível proteína monoculm (MOC1) (<i>O. sativa</i>)	XP_464476.1	+		574	1e-162	100
1R2b	A50a	Transporte de lipídios	Proteína hidrolase- BH2174 (<i>Bacillus halodurans</i>)	BAB05893.1	+		32	7,2	44
2R1a	B50a	Processo de ubiquitinação	Proteína de ligação/proteína ligase ubiquitina/ligação com íons de zinco (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_568885.1	+		38,9	0,06	44
2R1a	B71a	Transdução de sinais	Proteína Spry2 (<i>Danio rerio</i>)	AAQ22393.1	+		37,4	1,1	33
1R2b	A4b	Proteína hipotética	P0455H0310.22 (<i>O. sativa</i>)	NP_918636.1	+		33,9	6e-39	34
**	B79a	Proteína hipotética	DDB0186177 (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	XP_638391.1	+	+	32,7	4,2	36
2R1a	A56a	Proteína hipotética	Proteína hipotética (<i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	BAE04195.1	+		36,1	7,1	31
2R1a	B72a	Proteína hipotética	Proteína hipotética (<i>O. sativa</i>)	XP_464788.1	+		39,7	0,10	29
1R2b	A107b	Proteína hipotética	Proteína PY05162 (<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>)	XP_725581.1	+		33,9	4,0	39

+ R= Induzido na resistência e S= induzido na suscetibilidade; * Induzidos em 72 h.a.i.; ** Induzidos em 72 e 120 h.a.i. *** I= Identidade. 1= C101A51; 2= C104LAC23 e 3= CO39: R= resistente; S= suscetível e C= controle; 1= LFM 25; 2= IRGA 193.1.1. e 3= tratamento com água; a= 72 h.a.i. e b= 120 h.a.i. A legenda na segunda coluna identifica as combinações de oligonucleotídeos iniciadores pelas letras maiúsculas, o número representa a banda e a letra minúscula o fragmento eluído do gel de poliácridamida.

TABELA 4. (continuação)

cDNAs	Identificações	Categorias	Descrição da seqüência (Espécie)	Acesso	R	S	Escore	E Blast	I*** (%)
3S1a	B31b	Proteína hipotética	Proteína MGO 2395.4 (<i>Magnaporthe oryzae</i>)	XP_365693.1		+	34,3	1,5	89
1R2a	A109a	Função desconhecida	Seqüência completa do cromossomo 10 (<i>O. sativa</i>)	AE016959.3	+		41	1,0	100
2R1a	P15a	Função desconhecida	Proteína receptora de estrogênio (<i>Rattus norvegicus</i>)	AAN63608.1	+		35,8	6,1	24
*	B38i	Função desconhecida	Possível aldeído oxidase (OSJNAa0087H07.7) (<i>O. sativa</i>)	NM_194783.1	+	+	42,1	3,8	100
2R1a	B66a	Função desconhecida	Proteína BFLF2 (<i>Human herpesvirus 4</i>)	CAD53397.1	+		33.1	3.3	29
1R2a	E13b	Função desconhecida	mRNA similar à proteína quinase (<i>Pan troglodytes</i>)	XM_511350.1	+	+	40,1	8,0	100
**	F20b	Função desconhecida	Seqüência de microssatélite (<i>Penaeus monodon</i>)	AY753018.1	+	+	40,1	1,3	100
2R1a	N28a	Função desconhecida	Seqüência parcial do clone 7-5.5 subunidade ribossomal (Uncultured cercozoan)	AY620347.1	+		2512	0	100
1R2a	D33a	Função desconhecida	Clone OSJNBa0027P08.11 (<i>O. sativa</i>)	XM_472646	+		902	0	100
**	I64I	Função desconhecida	Seqüência completa do cromossomo 12 (<i>O. sativa</i>)	DP000011.1	+	+	14,3	3e-31	96
**	J25a	Função desconhecida	BAC clone RP23-183N18 (<i>Mus musculus</i>)	AC124175.2	+	+	42,1	4,0	100
**	I28c	Função desconhecida	Clone RP1-53C18 (<i>Homo sapiens</i>)	AL035079.14	+	+	42.1	0.34	96

+ R= Induzido na resistência e S= induzido na suscetibilidade; * Induzidos em 72 h.a.i.; ** Induzidos em 72 e 120 h.a.i. *** I= Identidade. 1= C101A51; 2= C104LAC23 e 3= CO39; R= resistente; S= suscetível e C= controle; 1= LFM 25; 2= IRGA 193.1.1. e 3= tratamento com água; a= 72 h.a.i. e b= 120 h.a.i. A legenda na segunda coluna identifica as combinações de oligonucleotídeos iniciadores pelas letras maiúsculas, o número representa a banda e a letra minúscula o fragmento eluído do gel de poliácridamida.

Os dois fragmentos monomórficos com o mesmo tamanho foram submetidos ao seqüenciamento B79a e B79i. A comparação das seqüências e a predição de função foram diferentes, o que corrobora com os relatos de problemas de co-migração de fragmentos de cDNA-AFLP (Durrant et al., 2000; Bruggmann et al., 2005; Vuylsteke et al., 2006).

Os fragmentos diferencialmente expressos foram comparados com as seqüências do genoma de *M. grisea* depositadas no “database” MGOS (www.mgosdb.org). O fragmento diferencialmente expresso obtido da interação entre a NIL CO39 quando inoculada com o isolado LFM 25, 72 h.a.i. apresentou similaridade de 89 % com o genoma de *M. grisea*, o que pode ser explicado pela presença de micélio de *M. grisea* em folhas de arroz suscetíveis. Kim et al. (2001) identificaram genes com homologia ao genoma de *M. grisea* em uma biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos em arroz obtida em uma interação compatível.

O fragmento diferencialmente expresso identificado em 1R2b foi obtido da interação entre a NIL C101A51 quando inoculada com o isolado IRGA 193.1.1., 120 h.a.i. O mesmo apresentou homologia com a proteína MONOCULM 1 (MOC1) de arroz. A proteína codificada pelo gene MOC 1 é um membro da família de proteínas GRAS, que possui um importante papel regulador em vários processos biológicos, pode estar localizada no núcleo da célula ou no citoplasma atuando na transdução de sinais e também em fatores de transcrição (Richards et al., 2000). A família de proteínas GRAS é caracterizada por apresentar um domínio conservado VHIID flanqueado por dois domínios ricos em leucina (LRR), uma região C-terminal conservada e N-

terminal variável que podem conferir especificidade (Bolle et al., 2000). A proteína MOC1 de arroz contém um domínio C-terminal (Richards et al., 2000) seguida por uma tirosina conservada com um possível sítio de fosforilação (Li et al., 2003). Dois domínios foram identificados em membros da subfamília PAT1 (Phytochrome A Signal Transduction), fotoreceptor que controla processos de desenvolvimento em plantas. Um desses, envolvido na transdução de sinais do fitocromo A em *Arabidopsis thaliana*, está localizado no citoplasma (Bolle et al., 2000). Duas proteínas CIGR1 e CIGR2 (chitin-inducible gibberellin-responsive) membros da família GRAS em arroz, são possíveis membros de reguladores da transcrição, podendo estar envolvidas em processos de defesa induzidas por elicitores químicos (Day et al., 2004). A presença de um fragmento diferencialmente expresso com o mesmo tamanho foi verificada para o cDNA 2R1a na NIL C104LAC quando inoculada com o isolado LFM 25, 72 h.a.i. No entanto, esse fragmento não foi seqüenciado. A homologia encontrada indica que esses cDNAs podem estar envolvidos na resposta de defesa à brusone do arroz.

Na interação entre a NIL C104LAC e o isolado LFM, 72 h.a.i., o fragmento expresso diferencialmente B50a apresentou homologia com a ubiquitina de ligação com domínio de zinco de *A. thaliana*. Trabalhos recentes apontam um papel importante das ubiquitinas na resposta de defesa em *A. thaliana* (Austin et al., 2002; Kim & Delaney, 2002; Xu et al., 2002) e em *Nicotiana benthamiana* (Peart et al., 2002).

O polipeptídeo de ubiquitina possui 76 resíduos conservados com papel importante em processos celulares em eucariotos através da conjugação com

outras proteínas intracelulares. A ubiquitinação de proteínas alvo inicia com a ativação de um complexo de enzimas E1, E2 e E3 identificadas como proteína-ubiquitina ligase. Os substratos formados pelos polímeros de ubiquitinas (cadeia de poliubiquitinização) são alvos de proteases dependente de ATP, denominadas de proteassomo 26 (Pickart, 2001). Mais de 1.300 genes podem codificar para a proteína ubiquitina ligase E3. As E3 de *A. thaliana* são agrupadas em diferentes classes baseadas na presença de domínios HECT, U-box ou RING. O domínio RING é similar ao domínio dedo de zinco de ligação de DNA com dois sítios de ligação de zinco em cisteína e histidina (Stone et al., 2005), no entanto, o domínio RING possivelmente atua como um domínio de interação proteína – proteína. Na interação entre *Cladosporium fulvum* e tomate foi identificado um clone que possui um domínio RING H2 dedo de zinco e um domínio hidrofóbico (Durrant et al., 2000).

Na interação entre a NIL C101A51 e o isolado IRGA 193.1.1., 72 h.a.i. foi identificado o fragmento A50a diferencialmente expresso envolvido no transporte de lipídios de localização citoplasmática. As fosfolipases são enzimas capazes de gerar lipídios que atuam como mensageiros secundários na transdução de sinais. Uma fosfolipase denominada de *OsPI-PLC1* (rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene) de arroz foi clonada e caracterizada por Song & Goodman (2002). A indução de *OsPI-PLC1* foi verificada pelo tratamento com vários indutores químicos de SAR e pela inoculação com isolados incompatíveis, indicando que o gene *OsPI-PLC1* pode estar envolvido na cascata de transdução de sinais intermediando a resistência à brusone em arroz.

A estrutura do DNA ou das possíveis proteínas codificadas fornece informação necessária sobre a função dos genes no genoma. Para tanto, a análise da expressão gênica permite a identificação de um grande número de genes simultaneamente. Entretanto, esses estudos necessitam ser complementados por análises funcionais *in vivo*.

CAPÍTULO IV

5. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE ESPECTRO AMPLO ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO ENTRE *Magnaporthe grisea* E ARROZ ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO SUBTRATIVA SUPRESSIVA (SSH)

5.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a expressão de genes de resposta de defesa e os mecanismos de transdução de sinais na interação entre *Magnaporthe grisea* e arroz têm aumentado nos últimos anos. Alguns componentes sinalizadores já foram identificados como o fator de transcrição da família Myb (JAmyb), a MAP quinase (BWMK1) e genes responsivos a elicitores em células em suspensão em arroz (He et al., 1999; Kim et al., 2000; Lee et al., 2001). Neste sentido, Xiong et al. (2001) identificaram 56 genes de defesa em arroz na resposta à infecção por *M. grisea* e aplicação de benzotiazole (BTH) e ácido jasmônico. Lu et al. (2004) isolaram 47 genes que foram induzidos ou suprimidos durante os primeiros estágios de infecção (12 e 24 horas após a inoculação).

Na tentativa de elucidar os mecanismos relacionados com a resposta de hipersensibilidade (HR) e a transdução de sinais associados contra o ataque de patógenos, Jung et al. (2005) utilizaram mutantes que mimetizam lesões de

brusone (*blm*). Os mutantes apresentaram indução de duas classes de PRs e a inoculação com isolados compatível e incompatível revelou altos níveis de fitoalexinas. A aplicação de H₂O₂ levou à indução de enzimas antioxidantes e acúmulo de compostos fenólicos na parede celular associados com a HR. Os resultados obtidos indicam que o gene *blm* confere resistência de espectro amplo a muitos patógenos e a HR está associada com a transdução de sinais.

A técnica de SSH de cDNAs amplifica seletivamente genes que apresentam expressão diferencial entre duas populações de mRNAs. A subtração de seqüências híbridas entre as duas populações de cDNA ocorre através da supressão de amplificações indesejáveis, pela separação física de cDNAs fita simples e de fita dupla. A técnica combina a PCR supressiva com os passos de normalização e subtração (Diatchenko et al., 1996).

O objetivo do presente trabalho foi identificar genes de resistência de espectro amplo envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz independente da raça do patógeno através da técnica de SSH. Ao nosso conhecimento, a técnica de SSH foi utilizada pela primeira vez para o estudo da interação entre *M. grisea* e arroz em duas NILs que contém diferentes genes de resistência.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal e isolados de *M. grisea*

Foram utilizadas três NILs de arroz: C104LAC que possui o gene de resistência *Pi-1*, C101A51 que possui o gene de resistência *Pi-2* e CO39 que não possui nem os genes de resistência *Pi-1* e *Pi-2*, e os isolados de *M. grisea* IRGA 193.1.1 e LFM 25. O material vegetal foi coletado 72 horas após a inoculação (h.a.i.) para a extração de RNA. O material vegetal, os isolados e as inoculações foram descritos no Capítulo II (Itens 3.2.1. e 3.2.2.).

5.2.2. Extração de RNA, isolamento de mRNA e síntese de cDNAs

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Molecular (LFM), do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS. A extração de RNA total, o isolamento de mRNA e a síntese de cDNAs foram obtidos conforme Capítulo III (Item 4.2.2.).

5.2.3. Controle da síntese dos cDNAs de fita simples

A síntese do cDNA fita simples (ss cDNA) foi verificada pela utilização de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam o cDNA codificante de uma actina (*Rac1*) de *Oryza sativa* com número de acesso no GenBank: X16280 (McElroy et al., 1990). A reação foi constituída de 2 µL da reação de síntese de ss cDNA; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTPs; 0,8 µM dos dois oligonucleotídeos iniciadores ACT-senso (5'- GAT CTG GCA TCA CAC CTT CTA C-3') e ACT-antisenso (5'- AGG AAG CTC GTA

GCT CTT CTC-3'); 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura (Milli-Q) até completar o volume de 25 μ L. A PCR foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; seguido de 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 60 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0 %, contendo tampão TBE 1 X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H₃BO₃ e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g.mL⁻¹), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). O marcador de massa molecular utilizado foi o de 1 Kb DNA (Invitrogen).

5.2.4. Controle da síntese dos cDNAs de fita dupla

A síntese do cDNA fita dupla (ds cDNA) foi verificada utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam o cDNA de actina conforme item 5.2.3. e realizada com 2 μ L dos ds cDNAs obtidos conforme Capítulo III (item 4.2.2.).

5.2.5. Construção das bibliotecas de cDNAs-SSH

Os tratamentos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

TABELA 1. NILs de arroz, isolados de *M. grisea* e fenótipo do material coletado em 72 h.a.i. utilizados na técnica de SSH. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2004

Tratamento	NILs de arroz	Isolado de <i>M. grisea</i>	Fenótipo*
1	C101A51	IRGA193.1.1.	Resistente
2	C039	IRGA193.1.1.	Suscetível
3	C104LAC	LFM 25	Resistente
4	C039	LFM 25	Suscetível

* R= Resistente e S= Suscetível

Quatro bibliotecas de cDNAs-SSH foram elaboradas: duas no sentido direto e duas no sentido inverso, conforme Tabela 2.

TABELA 2. Estratégia de obtenção das bibliotecas cDNAs-SSH para análise da expressão gênica diferencial na interação entre *M. grisea* e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2004

Sentido das bibliotecas	Identificação*	"Tester"	"Driver"	Subtração
1 Direto	R1	C101A51 (R)	C039 (S)	C101A51 (R) - C039 (S)= R
2 Inverso	S1	C039 (S)	C101A51 (R)	C039 (S) - C101A51 (R)= S
3 Direto	R2	C104LAC (R)	C039 (S)	C104LAC (R) - C039 (S)= R
4 Inverso	S2	C039 (S)	C104LAC (R)	C039 (S) - C104LAC (R)= S

*As legendas das figuras, dos géis e os resultados e discussão serão citados com a abreviatura das bibliotecas R1, S1, R2, S2.

5.2.5.1. Digestão dos cDNAs com a enzima de restrição *Rsa* I

Os cDNAs "tester" e os cDNAs "driver" foram clivados com a enzima *Rsa* I (Invitrogen). A reação de digestão foi composta por 47 µL dos cDNAs obtidos conforme descrito no Capítulo III (Item 4.2.2.); 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de MgCl₂; 15 U da enzima *Rsa* I e água ultra pura até completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada por 16 h a 37 °C e finalizada com a adição de EDTA (concentração final de 0,2 M). Em seguida os cDNAs foram purificados com o sistema "Wizard® SV Gel and PCR Clean-up" (Promega), conforme

instruções do fabricante. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,2 %, contendo tampão TBE 1 X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H₃BO₃ e 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: 1Kb DNA (Invitrogen) e o λ DNA/*Hind* III (Gibco/BRL) para estimar o tamanho e a concentração dos fragmentos amplificados, respectivamente.

5.2.5.2. Pareamento e ligação de adaptadores

Cada cDNA “tester” digerido foi dividido em duas amostras para a ligação dos adaptadores. Antes da ligação foi realizada a reação de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores de fita simples (Tabela 3). A reação foi constituída de 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5 – 8,0); 50 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador fita simples e água ultra pura até completar o volume de 10 µL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research), por 2 min a 95 °C seguido de uma incubação sob temperatura decrescente (subtração de 1,6 °C/min) até atingir a temperatura de 25 °C. O adaptador 1 foi constituído pelo pareamento dos oligonucleotídeos de fita simples Ad1-A e Ad1-B e o adaptador 2R foi constituído pelo pareamento dos oligonucleotídeos fita simples Ad2R-A e Ad2R-B.

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção dos adaptadores. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2004

Nome	Seqüência
Ad1-A	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'
Ad1-B	5'-ACCTGCCCCGG-3'
Ad2R-A	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'
Ad2R-B	5'- ACCTCGGCCG-3'

Após a reação de pareamento, os adaptadores foram ligados a cada amostra de cDNA “tester”. A reação foi composta de 1 µg do cDNA “tester”; 1 µg do adaptador; 30 mM de Tris-HCl (pH 7,8); 10 mM de MgCl₂; 10 mM de DTT; 1 mM de ATP; 5 U de T4 DNA Ligase (Promega) e água ultra pura até completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada por 16 h a 15 °C e, em seguida, incubada por 10 min a 70 °C para inativar a enzima, conforme protocolo de Powell & Gannon (2001). Controles não subtraídos foram realizados misturando os dois adaptadores a amostra de cDNA “tester”, seguindo as mesmas condições de ligação citadas acima. A concentração dos cDNAs “tester” foi estimada pela leitura em um espectrofotômetro (BioRad), pela absorvância a 260 nm (nanômetro) (A_{260}), utilizando como padrão 1 ($A_{260}=1$ equivale a uma concentração de 50 µg.mL⁻¹ de cDNA).

5.2.5.3. Controle da eficiência da ligação dos adaptadores aos cDNAs “tester”

O teste de eficiência da ligação dos adaptadores nos cDNAs “tester” foi realizado através da PCR com duas reações distintas onde foram utilizados tanto o oligonucleotídeo iniciador específico da região externa dos adaptadores

P1 no sentido senso (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3') e um oligonucleotídeo iniciador de um gene constitutivo de ferritina FER-Antisenso (5'-TGG ATG GAA GAA ACG AAA CC-3'); ou o oligonucleotídeo iniciador FER-Senso (5'-ATG CTA TGG AGT TGG CCT TG -3') e FER-Antisenso (5'-TGG ATG GAA GAA ACG AAA CC-3'). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados amplificam o cDNA codificante de uma ferritina de *O. sativa* com número de acesso no GenBank: AF519570 (Gross et al., 2003). A reação foi composta de 50 ng do produto da reação de ligação; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 200 μM de cada dNTPs; 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 25 μL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 36 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 48 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0 %, corados, visualizados e analisados conforme item 5.2.3.

5.2.5.4. Hibridização subtrativa primária

A reação de hibridização subtrativa primária foi constituída de 450 ng do cDNA “driver”; 15 ng de um dos dois cDNA “tester”; 0,4 M de NaCl; 20 mM de HEPES (pH 8,3); 0,4 mM de CTAB e água ultra pura até completar o volume de 10 μL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas

seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min e 30 s e após, redução para 68 °C durante 12 h.

5.2.5.5. Hibridização subtrativa secundária

A reação de hibridização subtrativa secundária foi constituída de 150 ng do cDNA “driver”; 0,3 µL do tampão de hibridização contendo 4 M de NaCl; 200 mM de HEPES (pH 8,3) e 4 mM de CTAB. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) a 95 °C por 1 min e 30 s. Após, foram adicionados aos cDNAs “driver” desnaturados as duas amostras de cada cDNA “tester” provenientes da hibridização subtrativa primária (Item 5.2.5.4.). A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) a 68°C por 8 h. Finalizada a hibridização foram acrescentados 200 µL do tampão de diluição contendo 20 mM de HEPES (HCl pH 8,3); 50 mM de NaCl e 0,2 mM de EDTA.

5.2.5.6. Amplificação supressiva primária

A amplificação supressiva primária foi constituída de 1 µL da reação obtida no item 5.2.5.5.; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 0,4 µM do oligonucleotídeo iniciador P1 (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 25 µL. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 75 °C por 5 min, 27 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 53 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s. Esse procedimento foi realizado com variações de 30, 33, 36 e 39 ciclos. A

cada ciclo foi retirada uma alíquota de 5 μ L. Os produtos das ampliações foram separados em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0 %, corados, visualizados e analisados conforme item 5.2.3. Os produtos das ampliações foram diluídos 10 vezes e utilizados para a reação de amplificação supressiva secundária.

5.2.5.7. Amplificação supressiva secundária

A amplificação supressiva secundária foi constituída de 1 μ L da reação obtida no item 5.2.5.6.; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de $MgCl_2$; 200 μ M de cada dNTP; 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador NP1 (5'-TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T-3') e NP2R (5'-AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 25 μ L. A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: 12 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 68 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s. Esse procedimento também foi realizado com variações de 15, 18, 21 ou 24 ciclos. A cada ciclo foi retirada uma alíquota de 5 μ L. Os produtos das ampliações foram separados em gel de agarose (Gibco/BRL) a 2,0 %, corados, visualizados e analisados conforme item 5.2.3. Os produtos da amplificação secundária supressiva foram purificados com o sistema "Wizard® SV Gel and PCR Clean-up" (Promega), conforme instruções do fornecedor.

5.2.6. Digestão dos produtos de amplificação

A reação de digestão foi constituída de 47 μ L da amplificação supressiva secundária obtida no item 5.2.5.7; 50 mM de Tris-HCl (pH8,0); 10 mM de $MgCl_2$; 15 U da enzima *Rsa* I (Invitrogen) e água ultra pura até completar um volume de 50 μ L. A reação foi incubada por 16 h a 37 °C e finalizada com a adição de EDTA (concentração final de 0,2 M). Em seguida, os cDNAs-SSH foram purificados com o sistema “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up” (Promega), conforme instruções do fabricante. A concentração do produto foi estimada em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,2 %, corados, visualizados e analisados conforme item 5.2.5.1.

5.2.6.1. Ligação dos cDNAs-SSH no vetor pLITMUS™38i

O DNA do vetor pLITMUS™38i (New England Biolabs) foi digerido através da mistura de 2 μ g de seu DNA; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de $MgCl_2$; 50 mM de NaCl; 6 U da enzima *EcoR* V (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 20 μ L. A reação foi incubada por 20 h a 37 °C e, em seguida, incubada a 20 min a 65 °C e 20 min à temperatura ambiente para inativação da enzima. Após, o vetor foi desfosforilado em uma reação contendo 5 mM de Tris-HCl (pH 9,3); 0,1 mM de $MgCl_2$; 100 μ M de $ZnCl_2$, 10 μ M de espermidina; 0,02 U da enzima fosfatase alcalina do intestino de vitelo – CIAP (Promega) e água ultra pura até completar o volume de 50 μ L. A reação foi incubada por 15 min a 37 °C, seguido de 15 min por 56 °C. Após, uma nova alíquota de 0,02 U de CIAP foi adicionada e a reação incubada nas mesmas condições anteriores. A reação foi finalizada pela adição de 300 μ L de uma

solução de parada contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM de EDTA; 200 mM de NaCl e 0,5 % de SDS. A reação foi purificada utilizando o sistema “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up” (Promega), conforme instruções do fabricante. A concentração do cDNA digerido foi estimada em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,2 %, corado, visualizado e analisado conforme item 5.2.3. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: 1 Kb DNA (Invitrogen) e λ DNA/*Hind* III (Gibco/BRL).

Na reação de ligação foi utilizada uma razão molar de vetor:inserir de 1:3. A reação foi composta de 100 ng do vetor digerido; 50 ng dos cDNAs-SSH digeridos; 50 mM de Tris-HCl (pH 7,6); 10 mM de MgCl₂; 1 mM de DTT; 1 mM de ATP; 5 % (p:v) de polietileno glicol-8000; 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 20 μ L. A reação foi incubada por 16 h a 14 °C e, em seguida, incubada por 10 min a 70 °C para a inativação da enzima. Após, a reação de ligação foi precipitada pela adição de 2 μ L de acetato de sódio (pH 7,5 M) e 50 μ L de etanol 100 % seguida de incubação por 16 h a – 20 °C. A reação foi centrifugada a 16.000 x g por 20 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi descartado e acrescentado 1 mL de etanol 70 % ao material precipitado. Nova centrifugação foi realizada a 16.000 x g por 5 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi descartado e o material precipitado ressuspenso em água ultra pura até completar o volume de 2 μ L.

5.2.6.2. Ligação dos cDNA-SSH no vetor pCR® 4-TOPO®

Para a ligação dos cDNAs-SSH no vetor pCR® 4-TOPO® do sistema “TOPO TA Cloning®” (Invitrogen) seguiram-se as instruções do fornecedor. A

reação foi constituída de 4 μL dos cDNAs-SSH digeridos; 1 μL da solução contendo 300 mM de NaCl; 1,5 mM de MgCl_2 e 1 μL do vetor (10 ng) do vetor. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 10 min.

5.2.6.3. Ligação dos cDNA-SSH no vetor pGEM[®]-T Vector Systems

Para a ligação dos cDNAs-SSH no vetor pGEM[®]-T (Promega) seguiram-se as instruções do fornecedor. A reação foi composta de 11 ng dos cDNAs-SSH purificados; 50 ng do vetor pGEM[®]-T; 5 μL de tampão de ligação contendo 60 mM de Tris-HCl (pH 7,8); 20 mM de MgCl_2 ; 20 mM de DTT; 2 mM de ATP; 10% de polietilenoglicol 8.000; 3 U de T4 DNA ligase e água ultra pura até completar o volume de 10 μL . A reação foi incubada por 24 h a 4 °C.

5.2.7. Transformação das reações de ligação

Os produtos das reações de ligação foram usados para transformação de células eletrocompetentes da estirpe XL-1 Blue (Stratagene, CA, USA) de *Escherichia coli* utilizando o eletroporador MicroPulser[™] (BIO RAD), seguindo as instruções do fabricante.

Primeiramente, 2 μL da reação de ligação foram misturados a 40 μL de células eletrocompetentes e incubadas durante 1 min no gelo, seguindo da eletroporação em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). Aplicou-se um pulso de 1,8 kV e, imediatamente, foi acrescentado 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido (Apêndice 2), e, após serem ressuspendidas, por pipetagem, as células foram transferidas para tubos de vidro e incubadas por 1 h a 37 °C sob agitação de 225 rpm. Após 1 h, as células foram plaqueadas, sendo duas placas para cada

transformação. Na primeira placa, uma alíquota de 100 μL das bactérias foi plaqueada em meio LB sólido (Apêndice 3). Na segunda, o restante do volume da transformação (900 μL) foi precipitado por centrifugação a 4.000 x g por 10 min a 4 °C, ressuspendido em 100 μL de meio LB líquido e plaqueado em meio LB sólido. Nos dois casos, o meio LB foi acrescido de 0,8 mg de X-Gal e de 0,8 mg de IPTG. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 h a 37 °C. As colônias recombinantes foram repicadas para placas contendo meio LB sólido mais 0,8 mg de X-Gal e 0,8 mg de IPTG. As concentrações dos antibióticos ampicilina e tetraciclina, no meio LB sólido, foram diferentes em função dos diferentes vetores utilizados e estão listadas na Tabela 4.

TABELA 4. Concentrações dos antibióticos utilizados para a seleção de *E. coli* transformadas com os diferentes vetores. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005

Vetores	Concentrações dos antibióticos	
	Ampicilina	Tetraciclina
pLITMUS™38i	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
pCR® 4-TOPO®	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
pGEM®-T	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

5.2.8. Análise das colônias transformadas pela PCR

Sob condições assépticas, parte de cada colônia foi adicionada à reação da PCR com o auxílio de uma ponteira de 0,2 mL autoclavada. A reação foi constituída de 300 μM de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl_2 ; 0,5 μM de cada oligonucleotídeo pUC/M13 Senso (5'-CGC CAC GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3') e pUC/M13 Antisenso (5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3'); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 20 μL . A reação foi incubada no

termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 50 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,5 %, corado, visualizado e analisado conforme item 5.2.5.1. Os fragmentos cDNA-SSHs recombinantes foram purificados com as enzimas ExoSAP-IT® (usb) pela incubação a 37 °C por 15 min, seguido de incubação a 80 °C por 15 min, conforme instruções do fornecedor.

5.2.9. Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR e 0,25 µM do oligonucleotídeo iniciador universal pUC/M13 Antisenso (5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3'), seguindo as instruções do fornecedor.

5.2.10. Análise da similaridade das seqüências

Os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltda). As seqüências foram submetidas ao programa VecScreen [(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) (Altschul et al., 1997)], a fim de identificar regiões

complementares aos plasmídeos. Após, foi realizada a comparação das seqüências obtidas com as seqüências de nucleotídeos (BLASTn) e proteínas (BLASTx) depositadas no GenBank: National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), através do programa BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul et al., 1997)]. As proteínas foram agrupadas em categorias funcionais, utilizando o programa COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins) (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG) do NCBI.

5.2.11. Macroarranjos de cDNAs

Os cDNAs-SSH obtidos foram submetidas à técnica de “reverse northern blot” para a confirmação de suas identidades. Um μL dos cDNAs obtidos no cDNA-SSH foram transferidos para membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences). Após, a membrana foi colocada a 80 °C por 2 h para fixação dos ácidos nucléicos. O “reverse northern blot” foi realizado utilizando os sistemas “Gene Images random prime labelling module” e “Gene Images CDP-Star detection module” (Amersham Biosciences). A membrana foi colocada em contato com a solução de pré-hibridização [5 X SSC (75 mM de citrato de sódio, 0,75 M de NaCl); 5 % de líquido de bloqueio (Amersham Biosciences); 0,1 % SDS e 5 % de sulfato de dextran] durante 1 h a 60 °C, com agitação.

As sondas utilizadas estão descritas na Tabela 5. Previamente, 50 ng dos cDNAs desnaturados foram submetidos ao processo de marcação. Assim, uma reação (50 μL) constituída de 5 U de enzima Klenow (Amersham biosciences), 10 μL de uma mistura de nucleotídeos (fluoresceína-dUTP, dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Amersham biosciences) foi incubada por 1 h a 37 °C para marcação

da sonda. Posteriormente, a sonda foi desnaturada por 5 min a 95 °C e colocada no líquido de pré-hibridização. A membrana contendo os cDNAs e o líquido de hibridização, que consistiu de líquido de hibridização contendo a sonda foram incubados a 60 °C por aproximadamente 16 h, com agitação. Após, a membrana foi submetida ao processo de lavagem com uma solução de 1 X SSC (15 mM de citrato de sódio e 0,15 M de NaCl) e 0,1 % de SDS, constituído de 2 repetições de 15 min a 60 °C, seguida de lavagem com a solução de 0,1 X SSC (1,5 mM de citrato de sódio e 0,15 M de NaCl) e 0,1 % SDS, duas vezes de 15 min a 60 °C. O processo de detecção do material hibridizado consistiu na incubação da membrana em solução de 10 % líquido de bloqueio (Amersham Biosciences), tampão A [100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 300 mM NaCl] durante 1 h a temperatura ambiente, com agitação. Em seguida, a membrana foi imersa em solução contendo tampão A, 0,1 % de BSA e 1:5.000 de anticorpo (v:v) (Amersham Biosciences). A membrana foi lavada três vezes por 10 min à temperatura ambiente com solução contendo 20 mL de tampão A e 0,3 % de TWEEN 20, seguida de uma lavagem com tampão A. O processo de hibridização e lavagem foi realizada no forno de hibridização (Hibridization oven/shaker, Amersham biosciences). Posteriormente, a membrana foi coberta com o líquido de detecção (Amersham biosciences) e incubada durante 1 h em contato com o filme de revelação (Kodak diagnostic film X-Omat™ XK1, Kodak). A revelação do filme foi realizada colocando o filme durante 30 s na solução de revelação (revelador e reforçador GBX, Kodak), 5 s em água destilada, 45 s no líquido fixador (Fixador e Reforçador GBX, Kodak)

e 5 s em água destilada. O filme foi fotografado utilizando o sistema de foto documentação computadorizada EDAS 120 (Kodak Digital Science 2d).

TABELA 5. Sondas utilizadas para a seleção diferencial da expressão de genes relacionados à defesa na interação entre *M. grisea* e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005

Genótipos	Tratamentos	Fenótipo
C101A51	LFM 25	Suscetível
C101A51	IRGA193.1.1.	Resistente
C101A51	*	Controle
C104LAC	LFM 25	Resistente
C104LAC	IRGA193.1.1.	Suscetível
C104LAC	*	Controle
Fanny	IRGA 185.1.1.	Suscetível
Fanny	*	Controle
Oryzica Llanos 5	IRGA 185.1.1.	Resistente
Oryzica Llanos 5	*	Controle
BR IRGA 410	IRGA 185.1.1.	Suscetível
IRGA 417	IRGA 185.1.1.	Resistente
IRGA 420	IRGA 185.1.1.	Resistente

* Tratamento com H₂O.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Síntese de cDNAs diferenciais através de SSH

No presente trabalho foi utilizada a técnica de SSH para identificar genes com expressão diferencial envolvidos na interação entre *M. grisea* e arroz, 72 h.a.i. Partimos da premissa de que este período poderia representar melhor a expressão dos genes que participam da resposta de defesa, a partir da análise do perfil eletroforético verificado com a técnica de cDNA-AFLP (Capítulo III).

Primeiramente, foi confirmada a presença dos ss cDNAs e ds cDNAs nas amostras “tester” e “driver” através da amplificação do fragmento de 474 pb com oligonucleotídeos iniciadores de actina (Figuras 1 A e B).

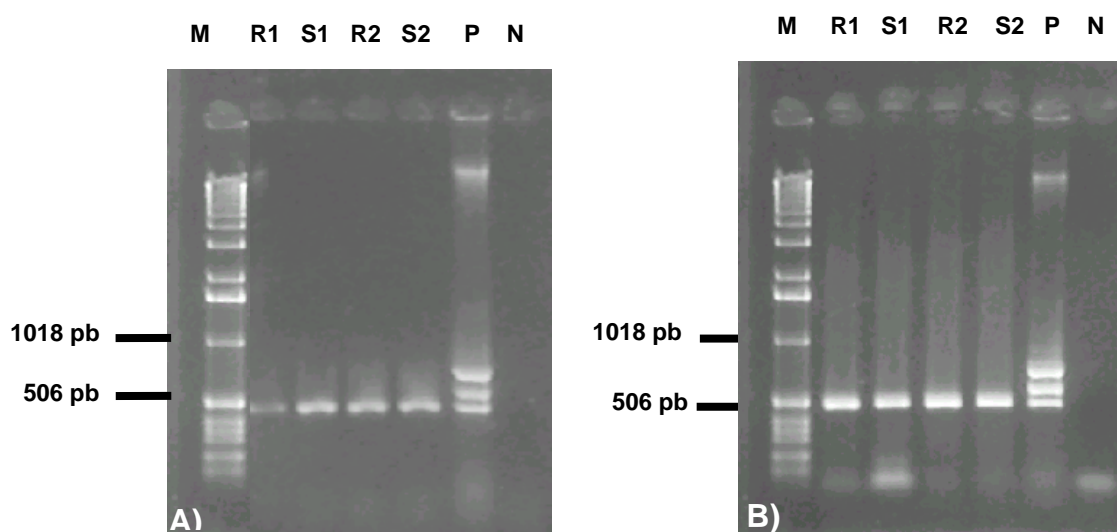


FIGURA 1. Perfis eletroforéticos das amostras amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores de actina. A) ss cDNA e B) ds cDNA. M= marcador de 1 Kb DNA. P= controle positivo DNA da NIL CO39 e N= controle negativo (H₂O). R1 e R2= bibliotecas resistentes e S1 e S2= bibliotecas suscetíveis. Os números à esquerda representam o tamanho em pb. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

A subtração foi realizada nos dois sentidos. Em um sentido, a população “driver” foi sempre usada com um excesso dos cDNAs sintetizados a partir da resposta de suscetibilidade (Bibliotecas S1 e S2) e a população “tester” provinha da resposta de resistência. Nesse caso se esperava isolar seqüências somente expressas, ou com expressão aumentada, na resposta de resistência. Contrariamente, quando a população “driver” continha os cDNAs sintetizados a partir da resposta de resistência (Bibliotecas R1 e R2) e a população “tester” provinha da resposta de suscetibilidade se esperava isolar seqüências não expressas, ou com expressão diminuída, durante a resposta de resistência. A identificação de clones em ambos sentidos permite identificar genes comuns, sem expressão diferencial, entre as duas bibliotecas (sentido direto e inverso).

Após, os ds cDNAs foram digeridos com a enzima de restrição *Rsa I*. A digestão dos fragmentos de cDNAs facilita a amplificação pela PCR dos diferentes fragmentos que representam genes diferencialmente expressos entre as duas populações (Diatchenko et al., 1996). Os produtos gerados tiveram, em média, 500 pb, os quais tendem a seguir uma cinética de hibridização homogênea, o que não ocorre com fragmentos muito grandes. Os fragmentos digeridos foram ligados aos adaptadores. Foi então realizado o teste de eficiência, o qual foi determinado pela intensidade relativa dos fragmentos que correspondem aos produtos amplificados das amostras 2 para 1 do adaptador Ad1; das amostras 4 para 3 do adaptador Ad2R, nas quatro bibliotecas (Figura 2). Uma diferença de quatro ou mais vezes na intensidade reflete a eficiência da ligação em 25 % ou até menos, o que pode vir a reduzir substancialmente a eficiência da subtração (Desai et al., 1996). Os fragmentos

de 421 pb correspondentes à amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores P1 e FER apresentaram intensidade menor que 25 % dos fragmentos de 298 pb, correspondentes à amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores de FER. Isso nos traz indícios que menos de 25 % do fragmento de FER foi ligado ao adaptador, em relação ao total de fragmentos de FER da amostra. Apesar disso, essas amostras foram submetidas às hibridizações subtrativas supressivas.

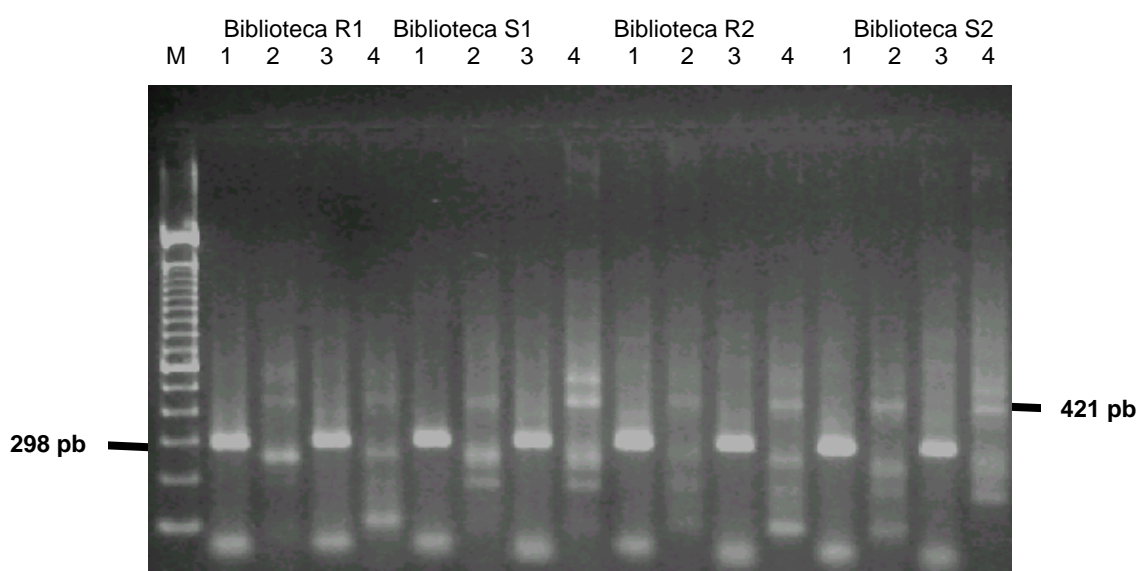


FIGURA 2. Perfis eletroforéticos do teste da eficiência da ligação dos cDNAs “tester” aos adaptadores Ad1 e Ad2R. Amostras 1 e 3: produtos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores FER senso e antisense no cDNA “tester” ligado aos adaptadores Ad1 e Ad2R, respectivamente. Amostras 2 e 4: produtos amplificados com os oligonucleotídeos de FER antisense e P1 senso no cDNA “tester” ligada aos adaptadores Ad1 e Ad2R, respectivamente. R1 e R2= bibliotecas resistentes e S1 e S2= bibliotecas suscetíveis. Os números à esquerda representam o tamanho em pb. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

Por outro lado, hibridizações bem sucedidas apresentam perfis eletroforéticos dos cDNAs das amostras subtraídas distintos daqueles observados nas amostras não subtraídas (Clontech, 2002), o que pode ser

observado na Figura 3. Os produtos obtidos após as subtrações foram analisados em gel de agarose e foi possível observar bandas discretas com 39 ciclos (Figura 3 A) a partir da amplificação supressiva primária e 24 ciclos (Figura 3 B) da amplificação supressiva secundária.

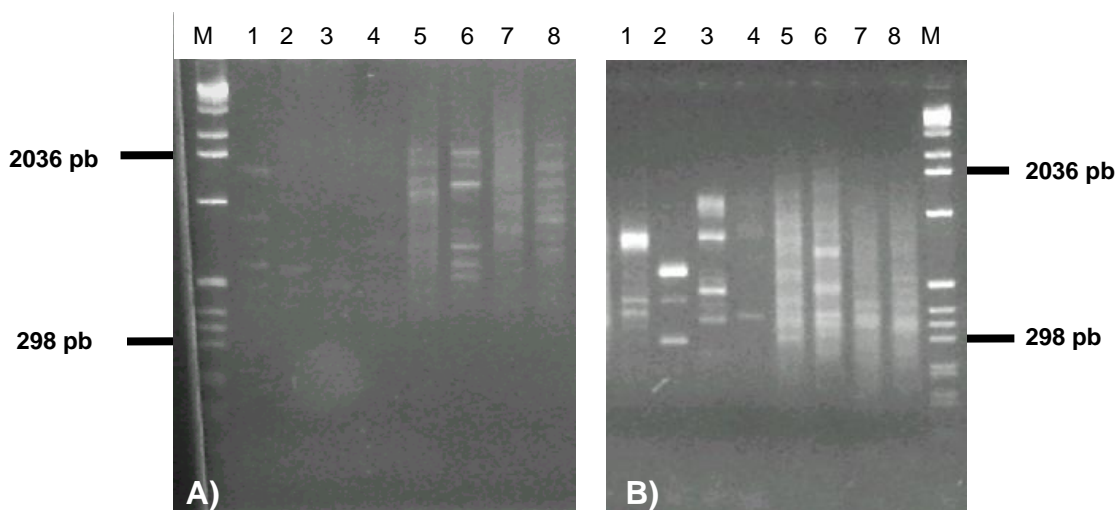


FIGURA 3. Perfis eletroforéticos das amplificações supressivas primária (A) e secundária (B). Os números de 1 a 4 representam as quatro bibliotecas subtraídas e de 5 a 8 as bibliotecas não subtraídas. Os números à esquerda representam o tamanho em pb. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

Os produtos diferenciais obtidos a partir da hibridização supressiva secundária e da amplificação supressiva secundária possuem uma representação de genes diferencialmente expressos enriquecida em relação às populações iniciais de cDNA total. Devido à complexidade dessa população, faz-se necessário a construção de bibliotecas dos fragmentos obtidos para permitir o seqüenciamento e a identificação da possível proteína codificada por cada um dos clones.

A ligação dos cDNAs-SSH foi realizada em três vetores e resultou em 1.554 clones. Após a análise da inserção por PCR, verificou-se que

aproximadamente 80 % dos clones ligados no vetor pLITMUS™38i não apresentaram insertos. A transformação dos produtos das reações de ligação com os vetores pLITMUS™38i e pCR® 4-TOPO® resultou em 89 clones recombinantes e com o vetor pGEM, 143 clones recombinantes. Melhores resultados foram obtidos com a transformação no vetor pGEM.

5.3.2. Análise da similaridade das seqüências

Duzentos e trinta e dois clones com tamanho médio de 650 pb foram selecionados, com base em diferenças de tamanho após análise por PCR, e seqüenciados (Figura 4). Foram obtidas seqüências de 79 clones na biblioteca R1, 59 na biblioteca S1, 64 na biblioteca R2 e 30 na biblioteca S2. O programa BLASTn foi utilizado para comparar as seqüências obtidas com seqüências previamente depositadas no Genbank com base na similaridade de nucleotídeos. Essa comparação permite verificar se as seqüências obtidas pertencem ao genoma do arroz. Os resultados obtidos indicaram que todos os 232 clones representam genes transcritos a partir do genoma do arroz.

A fim de descartar a possibilidade de que algum clone pudesse ser originado de *M. grisea*, os clones foram comparados com as seqüências do genoma desse fungo depositadas no banco de genes MGOS (www.mgosdb.org). Nenhum dos clones apresentou homologia com seqüências do genoma de *M. grisea*. Esses resultados indicam que provavelmente exista pouca diferença na expressão de genes entre plantas resistentes e suscetíveis no período de coleta do material vegetal (72 h.a.i.).

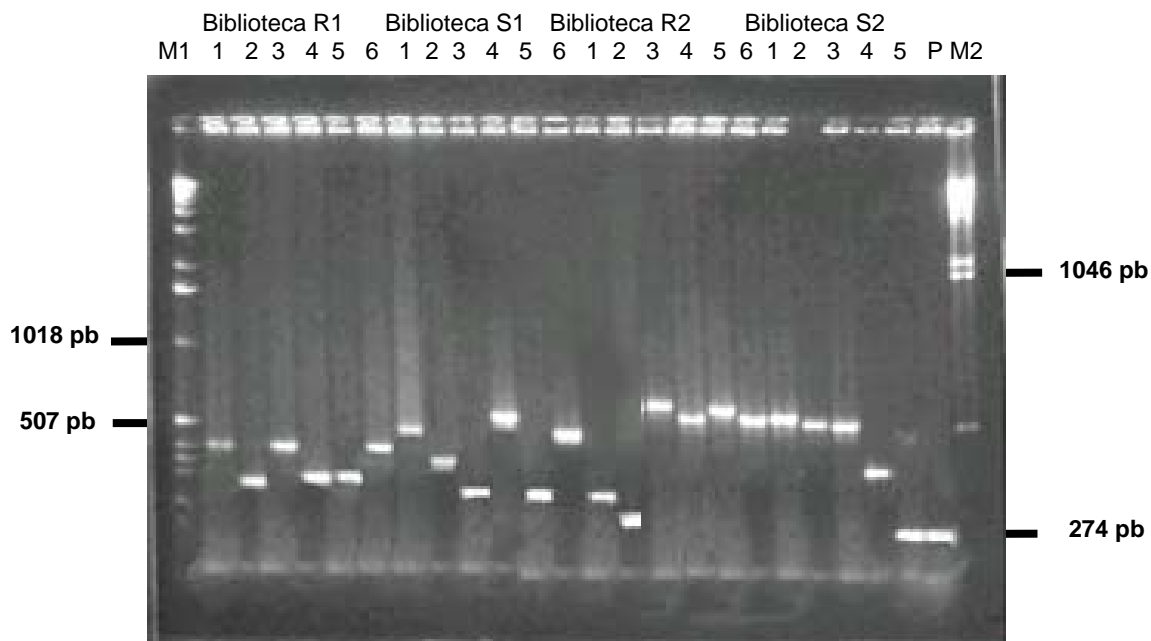


FIGURA 4. Perfis eletroforéticos das ampliações com os oligonucleotídeos iniciadores pUC/M13 em colônias recombinantes das quatro bibliotecas SSH. M1= marcador de 1 Kb DNA e M2= λ DNA/Hind III. P= controle positivo do vetor intacto (274 pb). R1 e R2= bibliotecas resistentes e S1 e S2= bibliotecas suscetíveis. R1 e R2= bibliotecas resistentes e S1 e S2= bibliotecas suscetíveis. Os números à esquerda representam o tamanho em pb. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

O programa BLASTx foi aplicado para comparação das seqüências obtidas com as seqüências de proteínas previamente depositadas no Genbank. Essas proteínas foram agrupadas em categorias funcionais, listadas na Tabela 6, utilizando o programa COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins) do NCBI e distribuídas em gráficos para melhor visualização (Figuras 5, 6, 7 e 8).

TABELA 6. Análise da similaridade dos clones seqüenciados e isolados na técnica de SSH na interação entre *M. grisea* e arroz. LFM/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005

Categorias	Clone	Descrição (Espécie)	Nº de acesso	R1*	S1	R2	S2	Escore	E Blast	I**(%)	r***
Grupo I: Processo celular											
Metabolismo e transporte de íon inorgânico	OsR67/ OsS80	Proteína de membrana plasmática H ⁺ -ATPase (<i>Oryza sativa</i>)	CAD29313.1			1	1	250	3e-65	87	2
	OsR2 OsR65	Possível dioscorina (<i>O. sativa</i>)	NP_913840.1	10		1		136	2e-31	97	11
Mecanismo de transdução de sinais	OsS176	Pseudo regulador de resposta (<i>O. sativa</i>)	BAD46270.1				4	246	1e-63	63	4
	OsR4/ OsS135	Possível proteína quinase HvPKABA1 (induzida por ácido absísico) (<i>O. sativa</i>)	NP_914767.1	3	4			114	1e-24	98	7
	OsS126	Possível proteína 3111 (<i>Mus musculus</i>)	XP_357051.3		1			34,7	1,1	36	1
	OsR172	Proteína fosfatase (<i>O. sativa</i>)	XP_468432.1			1		128	8e-29	100	1
Biogênese e envelope celular	OsS25	Sucrose sintase 2 (<i>O. sativa</i>)	AAL31375.1		11			124	1e-27	100	11
Grupo II: Processamento e armazenamento de informação											
Fator de transcrição	OsS52	Fator AP2D9 (<i>O. sativa</i>)	AAW78372.1		1			129	3e-29	98	1
	OsR110	Gene homeobox (<i>O. sativa</i>)	BAA77822.2	1				73,6	4e-12	91	1
	OsR90	Possível HMGd1 (<i>O. sativa</i>)	BAD33893.1	15				65,1	8e-10	90	15
	OsS32	Possível fator de splicing rico em arginina/serina RSp41 (<i>O. sativa</i>)	XP_463926.1		1			41,2	0,034	46	1
	OsR68	Possível RNA polimerase fator sigma (<i>O. sativa</i>)	XP_475997.1			3		167	1e-40	83	3
	OsR192	Proteína Scarecrow (<i>O. sativa</i>)	NP_915059.1	1				248	3e-64	81	1
Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	OsR198	Possível proteína tradução fator Sui1 (<i>O. sativa</i>)	XP_475493.1	1				88,2	9e-17	100	1
Reparo, recombinação e replicação de DNA	OsR22	Possível DEAH-box RNA helicase (<i>O. sativa</i>)	XP_478319.1	1				128	8e-29	95	1

* Número de clones em cada biblioteca; I**= Identidade; ***r= número de clones redundantes

TABELA 6. (continuação)

Categories	Clone	Descrição (Espécie)	Nº de acesso	R1*	S1	R2	S2	Escore	E Blast	I**(%)	r***
Grupo III: Metabolismo											
Metabolismo e transporte de aminoácidos	OsS130	Fator eIF-2 gama (Fator de iniciação de transdução) cadeia F2OD22.6 (<i>O. sativa</i>)	ABA99260.1		1			201	7e-51	97	1
	OsR111	Possível descarboxilase serina (<i>O. sativa</i>)	BAD28221.1	1				62,8	4e-09	100	1
Metabolismo de coenzima	OsR99	S-adenosil metionina sintetase (<i>O. sativa</i>)	CAC82203.1	1				276	6e-73	96	1
	OsS24	Possível subunidade magnésio quelatase ATPase (<i>O. sativa</i>)	XP_462936.1		1			164	9e-40	88	1
Conversão e produção de energia	OsR17	Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase dependente de NADH- (<i>O. sativa</i>)	AAO72558.1	1				377	2e-103	98	1
	OsR187	Álcool desidrogenase (<i>O. glumipatula</i>)	BAE00047.1	1				493	4e-05	81	1
Metabolismo e transporte de carboidrato	OsR8/ OsR23	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH citosólico (<i>O. sativa</i>)	AAN59792.1	2				284	1e-75	97	2
	OsR206/ OsS177	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase grande subunidade (<i>O. sativa</i>)	CAG34174.1	2				140	2e-32	98	2
	OsS177	Possível β -galactosidade (<i>O. sativa</i>)	AAV59405.1				3	256	4e-67	62	3
	OsS81/ OsS82	Frutose-bisfosfato aldolase isoenzima C-1 (<i>O. sativa</i>)	BAD82731.1				2	111	7e-24	100	2
	OsR140	Possível triosefosfato isomerase (<i>O. sativa</i>)	NP_915433.1			26		138	1e-31	98	26
	OsR95	Possível transaldolase ToTAL2 (<i>O. sativa</i>)	XP_480152.1	14				179	7e-44	95	14
	OsS31	Predito produto do gene D OJ1791_B03.34 (<i>O. sativa</i>)	XP_506852.1		1			172	4e-42	100	1
Biossíntese de metabólitos secundários	OsR109	Neuron navigator 2 (<i>Gallus gallus</i>)	XP_420909.1	1				32	7,4	36	1
	OsS56	Peptídeo não ribossomal relacionado a proteínas sintetase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	XP_00140020.2		1			32,7	4,3	33	1
Grupo IV: Outras categorias****											
Processo de ligação	OsR123	ATP/ADP translocador produto do gene OJ2056_H01.33 (<i>O. sativa</i>)	XP_467495.1	1				73,9	7e-12	46	1
	OsR89	Actina (<i>Linum usitatissimum</i>)	AAW34192.1	1				32,7	4,3	100	1
Processo de ligação de DNA e íon de zinco	OsR203	Proteína dedo de zinco (<i>O. sativa</i>)	AAQ84334.1	1				64,7	1e-0,9	100	1

* Número de clones em cada biblioteca; I**= Identidade; ***r= número de clones redundantes; ****Função identificada no programa BLASTw2 do EMBL-EBI.

TABELA 6. (continuação)

Categorias	Clone	Descrição (Espécie)	Nº de acesso	R1*	S1	R2	S2	Score	E Blast	I**(%)	r***
Biossíntese de proteína	OsR171	Proteína 40S subunidade ribossomal (<i>O. sativa</i>)	XP_469197.1			1		78,2	9e-14	97	1
	OsR139/ OsR167	Possível mio-inositol oxigenase (<i>O. sativa</i>)	BAD53821.2			2		68,6	7e-11	100	2
Grupo V: Pouco caracterizada											
Predição de função Geral	OsR123	Possível proteína foliar (<i>O. sativa</i>)	NP_922190.1			10		353	3e-96	98	10
	OsR125	Possível proteína Ttc9 (<i>Mus musculus</i>)	AAH28891.1	1				31,6	9,6	51	1
	OsR20	Possível proteína de ligação calmodulina (<i>O. sativa</i>)	XP_478167.1	1				38,1	0,10	100	1
	OsR153/ OsR163	Possível produto do gene OJ1136_C12.20-2 (<i>O. sativa</i>)	XP_507550.1			2		143	2e-33	100	2
Função não conhecida	OsR18	Proteína não conhecida (<i>O. sativa</i>)	BAD53641.1	1				204	1e-51	100	1
	OsR19	Lipogenina (<i>Rattus norvegicus</i>)	AAL18254.1	1				34,3	1,7	27	1
	OsS28	Proteína expressa (<i>O. sativa</i>)	ABB46758.1		15			103	2e-21	97	15
	OsR100	Proteína não conhecida (<i>O. sativa</i>)	XP_464385.1	1				154	8e-37	100	1
	OsR160	Possível proteína fiber Fb2 (<i>O. sativa</i>)	XP_465147.1			3		81,6	8e-15	100	3
	OsR107	Proteína hipotética (<i>O. sativa</i>)	AAU90183.1	1				109	3e-23	98	1
	OsR1	Proteína hipotética LOC_Os12g33150 (<i>O. sativa</i>)	ABA9871.1	1				89	5e-17	95	1
	OsS180	Proteína hipotética conservada (<i>Plasmodium chabaudi</i>)	CAH79677.1				1	33,1	3,3	33	1
	OsR92/ OsS174	Possível PRP8 (<i>O. sativa</i>)	XP_475644.1	7		5	6	63,9	2e-0,9	97	18
	OsR72/ OsR119	Proteína hipotética (<i>O. sativa</i>)	XP_481853.1	2		2		149	3e-55	80	4
	OsS37	Proteína hipotética (<i>Erwinia amylovora</i>)	NP_758765.1		1			41,6	0,009	46	1
	OsS175	Proteína hipotética do produto do gene OJ1191_A10.128 (<i>O. sativa</i>)	XP_507596.1				6	470	3e-129	90	6
	OsR103	Possível antígeno similar CD164 (<i>Bos taurus</i>)	XP_586867.2	1				33,5	3,7	42	1
	OsS212	Proteína hipotética GLP_301_8562_8125 (<i>Giardia lamblia</i>)	XP_767659.1		1			32,3	5,6	31	1
	OsR164	Possível ribulose biscofosfato carboxilase, pequena sub unidade (<i>O. sativa</i>).	ABA97180.1			3		92	6e-18	100	3
	OsS132/ OsS239	Proteína hipotética 3 (<i>Microplitis demolitor bracovirus</i>)	YP_239367.1		1		1	68,6	7e-11	75	2
OsS129	Proteína hipotética (<i>Burkholderia pseudomallei</i>)	ABA503411		1			37,0	0,23	84	1	

* Número de clones em cada biblioteca; I**= Identidade; ***r= número de clones redundantes; ****Função identificada no programa BLASTw2 do EMBL-EBI.

TABELA 6. (continuação)

Categorias	Clone	Descrição (Espécie)	Nº de acesso	R1*	S1	R2	S2	Score	E Blast	I**(%)	r***
	OsS78/ OsS79	OSJNBb0039L24.13 (<i>O. sativa</i>)	XP_473296.1				2	38,5	0,079	100	2
	OsS208	Cadeia anti-cardiolipina imunoglobulina de metal (<i>Homo sapiens</i>)	AAL57392		3			31,6	9,5	38	3
	OsS211	BHLF1 (<i>Human herpesvirus 6</i>)	CAA45603.1		4			32,3	5,6	30	4
	OsS213	Possível proteína como neurobeachin/beige (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	EAN86641.1		4			33,1	3,3	30	4
	OsS136	Proteína precursora similar ao locus neurogênico (<i>Strongilocentrotus purpuratos</i>)	XP_791409.1		1			34,7	1,5	37	1
	OsR91	Proteína degenerativa retinal (<i>Canis familiaris</i>)	NP_001003289.1	1				31,6	9,7	32	1
			NP_912512.1	1				51,6	1e-0,5	92	1
			XP_479717.1		1			81,6	8e-15	100	1
			XP_797250.1		1			33,1	3,4	48	1
VI Sem similaridade											
				1	5	5	3				14

* Número de clones em cada biblioteca; I**= Identidade; ***r= número de clones redundantes; ****Função identificada no programa BLASTw2 do EMBL-EBI.

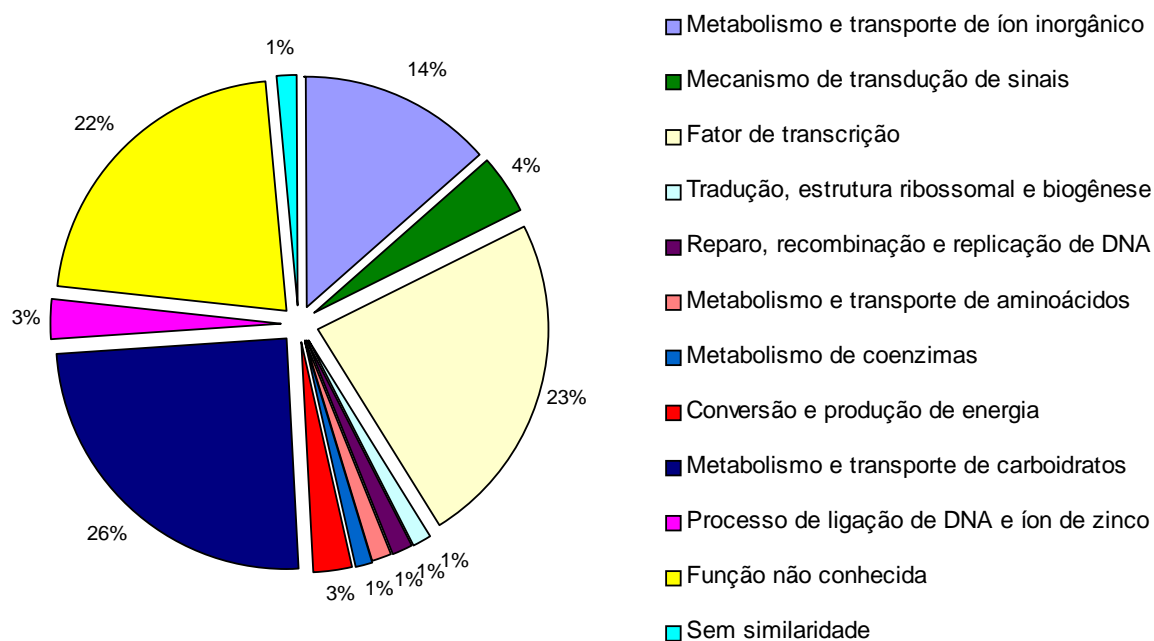


FIGURA 5. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca R1 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

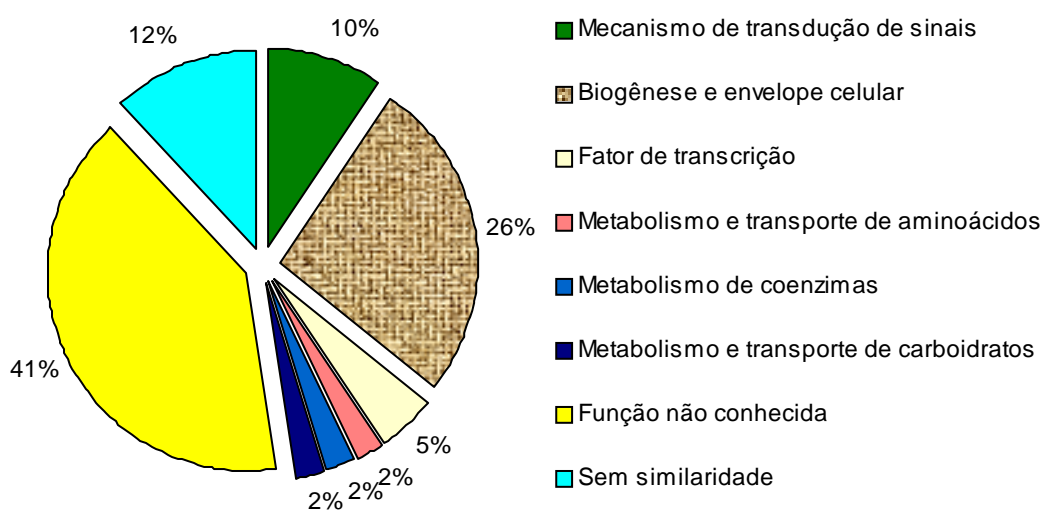


FIGURA 6. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca S1 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

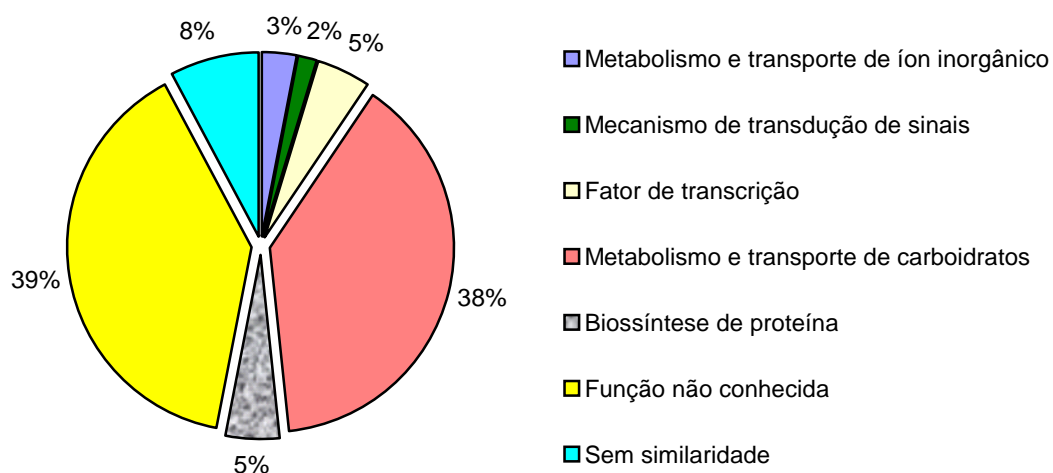


FIGURA 7. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca R2 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

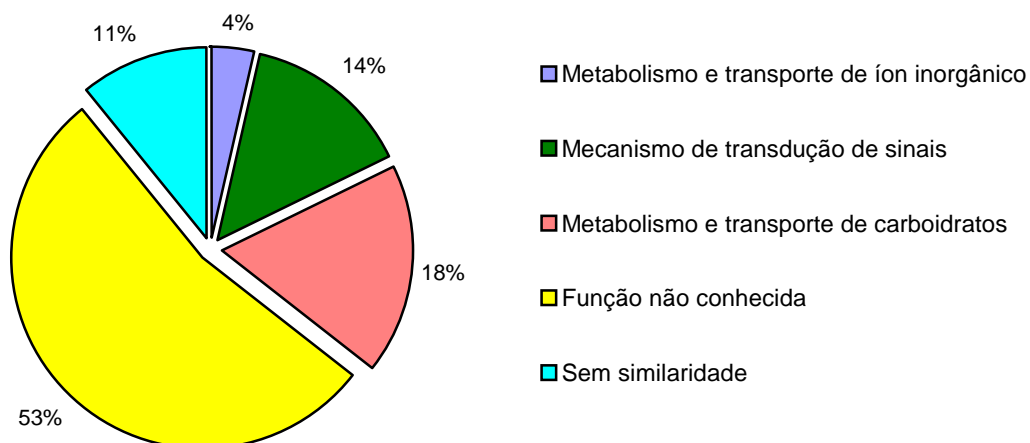


FIGURA 8. Categorização funcional dos clones SSH obtidos da biblioteca S2 de arroz utilizando o programa COGs do NCBI. LFM/UFRGS, Porto Alegre/RS, 2005.

Entre os clones obtidos, 6 % não apresentaram similaridade com nenhuma proteína conhecida. Já as seqüências de 17 clones (7,3 %) apresentaram similaridade, com base na comparação de nucleotídeos, com as seqüências do genoma do arroz. Entretanto, não possuem homologia com proteínas de arroz e por essa razão não foram consideradas nesse estudo. Futuros estudos poderiam esclarecer o envolvimento dessas proteínas durante a defesa. Outros 40 % estão na categoria de proteínas pouco caracterizadas, isto é, possuem homologia com as proteínas de arroz depositadas no banco de genes, mas sem função definida. Os demais clones produziram seqüências agrupadas em diferentes categorias funcionais (Tabela 6).

5.3.2.1. Processo celular

Na categoria de processo celular foi verificado nos clones OsR67 e OsS80 a presença de um gene que codifica a proteína de membrana plasmática H⁺-ATPase induzida nas bibliotecas R2 e S2 (Tabela 6). As respostas de defesa podem estar associadas com receptores localizados na membrana plasmática (Vera-Estrela et al., 1992). Vera-Estrela et al. (1994) encontraram o aumento da atividade da proteína de membrana H⁺-ATPase em plantas de tomate resistentes a *Cladosporium fulvum*. Os autores verificaram um aumento de 4 vezes na atividade da proteína H⁺-ATPase através da acidificação do meio extracelular após o tratamento com elicitores produzidos pelo fungo. Foi verificado também que o aumento da atividade da proteína H⁺-ATPase é devida a desfosforilação da fosfatase ativada através da G-proteína. Os resultados do presente trabalho indicam a possibilidade dessa proteína estar envolvida em um mecanismo comum de resposta de defesa, já que foi verificado em ambos os

tipos de interação, incompatível e compatível, a 72 h.a.i. Já a presença da proteína fosfatase, codificada pelo gene identificado no clone OsR172, somente na biblioteca R2, pode ser sido um fator determinante para a manutenção da resistência e ativação de mecanismos de transdução de sinais na interação entre a NIL C104LAC quando inoculada com o isolado LFM 25. Os processos celulares são regulados pela fosforilação de proteínas em animais e vegetais. A fosforilação e desfosforilação de proteínas regulatórias e enzimas são mecanismos gerais para transmitir sinais do ambiente extracelular para o interior das células. As proteínas fosfatases modulam e revertem os mecanismos fosforegulatórios (Rodriguez, 1998). O clone OsR172 envolvido no mecanismo de transdução de sinais codifica para a proteína fosfatase 2A (PP2A) e a análise através do programa CD-Search do NCBI revelou a presença de um domínio conservado de PP2A de serina/treonina. As proteínas fosfatases do tipo 2A participam de uma cascata de transdução de sinais necessária para o ciclo celular, desenvolvimento e resistência a doenças segundo Cooper et al. (2003). A especificidade de PP2A é devida à combinação de diferentes subunidades catalíticas e regulatórias.

A dioscorina foi outra proteína identificada nas bibliotecas R1 e R2. Essa proteína está envolvida no metabolismo e transporte de íon inorgânico e é considerada uma proteína de armazenamento. Shewry (2003) relata que essas proteínas caracterizam funções de armazenamento e de defesa. Hou et al. (1999 e 2001) mostraram que a dioscorina purificada de *Dioscorea batatas* tem propriedade antioxidante. A análise através do programa CD-Search do NCBI revelou que a proteína codificada pelos clones OsR2 e OsR65 apresenta um domínio conservado específico de anidrase

carbônica. Kim et al. (2001) e Xiong et al. (2001) identificaram clones que codificaram para a anidrase carbônica em arroz em resposta à infecção por *M. grisea*. O aumento da atividade de espécies de oxigênios reativos (ROS) sobre condições de estresse quando acumulados em altos níveis tornam-se tóxicos às células (Subramanian et al., 2005). Moléculas antioxidantes, enzimas simples e um sistema mais complexo de detoxificação podem estar envolvidos na defesa celular contra ROS acumulados (Resende et al., 2003). Anidrase carbônica pode ter uma função protéica de ligação com ácido salicílico e como antioxidante na resposta de defesa. Em tomate, foi demonstrado que o silenciamento de uma anidrase carbônica levou à ausência da resposta de hipersensibilidade em *Nicotiana benthamiana* mediada pela interação *Pto:avrPto* (Slaymaker et al., 2002). Estes resultados indicam uma possível função da anidrase carbônica na resposta de defesa.

5.3.2.2. Metabolismo

Reguladores vegetais como o etileno, o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o ácido absísico apresentam função sinalizadora nas respostas de resistência. Foi possível isolar na biblioteca R1 o clone OsR99, codificante da enzima S-adenosil-metionina-sintetase (SAM sintetase) que pode levar à síntese de etileno ou de poliaminas. O acúmulo em grande quantidade de mRNA de 2 a 4 vezes no nível de transcrição do gene que codifica para SAM foi verificado em condições de estresse à seca em arroz (Breusegem et al., 1994) e em *Petroselinum crispum* quando tratada com elicitor de *Phytophthora megasperma* f. sp. glaucina (Kawalleck et al., 1992). Uma S-adenosil-L-metionina: ácido salicílico carboxil metil transferase e uma S-adenosil-L-

metionina: carboxil metil transferase foram altamente induzidas na resistência à *M. grisea* em arroz (Lu et al., 2004). O gene S-adenosil-L-metionina: carboxil metil transferase foi induzido pelos tratamentos com cobre, metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico e inoculação com *Leptosphaeria maculans* em *Brassica carinata* (Zheng et al., 2001).

O gene identificado no clone OsR95 codifica transaldolases e foi encontrado em alta redundância na biblioteca R1. Essas enzimas estão envolvidas nos processos de metabolismo de várias pentoses-fosfato, gerando altos níveis de NADPH, sugerindo seu envolvimento com as espécies de ROS e detoxificação celular (Banki et al., 1996; Vatanaviboon et al., 2002). A geração de NADPH, importante co-fator envolvido em muitos sistemas enzimáticos, faz parte do sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo (Vatanaviboon et al., 2002). No entanto, atualmente, existe pouca informação na regulação das transaldolases em plantas.

5.3.2.3. Processamento e armazenamento de informação

Como pode ser observado na Tabela 6, foi identificado também na biblioteca R1 o clone OsR192, um fator de transcrição da família GRAS que apresentou homologia com a proteína "Scarecrow". A análise através do programa CD-Search do NCBI revelou que o clone OsR192 possui domínio N-terminal variável, um C-terminal conservado. Além disso cinco domínios importantes foram identificados (Bolle et al., 2000). As proteínas da família GRAS são consideradas fatores de transcrição e podem estar envolvidas em processos de desenvolvimento e outros processos de defesa induzidos por elicitores químicos (Day et al., 2004).

Os resultados do presente estudo revelaram a presença de enzimas envolvidas no ciclo de Calvin (Malkin & Niyogi, 2000). Foram identificadas as enzimas triose fosfato isomerase (TFI) na biblioteca R2, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a grande subunidade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase na biblioteca R1.

O gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase codifica para a proteína citosólica glicolítica (Jeong et al., 2000). Contudo, estudos recentes aumentam as evidências de que essa proteína é bifuncional, sendo encontrada em diversas localizações celulares em eucariotos. A proteína GAPDH está envolvida no controle da atividade de fosfolipases D2 (PDL2) em células PD12 em humanos (Kim et al., 2003). Os autores relatam que o H_2O_2 modifica os resíduos de cisteínas da GAPDH, não apenas inativando a enzima, mas causando mudanças estruturais para que a GAPDH participe da interação proteína-proteína. Mais recentemente, foi demonstrado que GAPDH pode ter um papel para mediar a sinalização de ROS em *Arabidopsis in vitro* (Hancock et al., 2005). Embora *gapdh* seja considerado um gene constitutivo em muitos organismos, existe evidência de que ocorra expressão diferencial em diferentes condições celulares. Ainda, o mesmo clone foi identificado na biblioteca S2.

Segundo Subramanian et al. (2005), o aumento da atividade das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin como a rubisco e a TPI sugerem a possibilidade de que plantas resistentes tenham alta eficiência fotossintética podendo contribuir para a habilidade contra o ataque de patógenos. Por outro lado, em plantas suscetíveis a eficiência fotossintética é menor principalmente em folhas que expressam lesões necróticas devido ao fechamento dos estômatos. Resultados similares foram obtidos por Matsumura et al. (2003), onde vários genes relacionados à fotossíntese foram

suprimidos em *Nicotiana benthamiana*, somente após 1 h da infiltração com elicitor de *Phytophthora infestans*.

O clone OsR198 foi identificado como codificante do gene fator *sui1*, que é considerado um gene constitutivo. Pesquisa realizada no CD-Search do NCBI revelou que a proteína SUI1 possui um domínio SUI1/eIF1 (fator de iniciação em eucariotos). Além de eucariotos, também é encontrado em algumas bactérias com papel importante no reconhecimento do códon de iniciação no início da tradução. Possui domínios de ligação com RNA. No entanto, o mecanismo de ação dessa proteína ainda não é conhecido.

O clone OsR90 está relacionado com um grupo de proteínas HMG (high-mobility group) acumulado em plântulas de arroz submetidas ao frio (acesso GenBank número gb AAC78104). A análise no CD-Search do NCBI revelou a presença de membros de uma superfamília de proteínas de ligação de DNA que estão envolvidas nos mecanismo de transcrição (Costigan et al., 1994).

5.3.2.4. Outras categorias

A proteína dedo de zinco identificada na biblioteca R1, clone OsR203, atua como um regulador negativo da resposta de hipersensibilidade limitando a extensão da morte celular. O gene *LSD1* de *A. thaliana* é um membro da família de proteínas dedo de zinco dependente dos sinais produzidas por ROS. A proteína codificada pelo gene *LSD1* apresenta homologia com terminal carboxil que intervém na rápida resposta aos estímulos externos (Dietrich et al., 1997). Algumas proteínas homólogas ainda atuam

como fatores de transcrição utilizando domínios de ligação de DNA. Os sinais transmitidos pelos patógenos podem ativar esses genes regulatórios.

O gene codificante para mio-inositol oxigenase foi identificado nos clones OsR139 e OsR167 da biblioteca R3. Lorence et al. (2004) apresentaram evidências bioquímicas e moleculares da participação do mio-inositol oxigenase como substrato para a biossíntese do ascorbato. O ascorbato (ácido-L-ascórbico-AsA, vitamina C) é um dos maiores antioxidantes em plantas, sendo encontrado em concentrações pequenas em folhas. Está envolvido em vários processos relacionados à fotossíntese, à expansão celular, à alongação de raízes, ao transporte de elétrons trans-membrana, ao estresse oxidativo provocado por fatores ambientais, ferimentos e patógenos (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff, 2000; Lorence et al., 2004), participando de várias reações enzimáticas importantes. Lorence et al. (2004) relataram um acréscimo de 2 a 3 vezes no aumento de AsA em folhas de plantas transgênicas de *A. thaliana* super expressando a enzima mio-inositol. Loewus & Murthy (2000) sugerem que a enzima mio-inositol pode participar da biogênese de pectina, hemicelulose e outros compostos da parede celular, os quais podem levar a um aumento da resistência.

5.3.2.5. Proteínas pouco caracterizadas

Alguns cDNAs sem função conhecida foram identificados no presente estudo, os quais podem representar um passo importante para a resistência à brusone do arroz. É importante ressaltar que alguns cDNAs foram induzidos somente em uma interação incompatível (R1 ou R2) conforme Tabela 6. Por outro lado, a expressão de outros cDNAs foi induzida nas duas interações (R1 e R2) e reprimidos nas interações

compatíveis. Esses cDNAs, que foram expressos nas interações incompatíveis podem ser utilizados para estudos futuros e a sua função na interação entre *M. grisea* e arroz necessita ser caracterizada. A obtenção de um conjunto de genes alvo é importante para estudos subsequentes de análise funcional *in vivo*.

5.3.3. Análise da expressão diferencial por macroarranjos de cDNAs

Noventa clones foram analisados via macroarranjos de cDNAs, o restante dos clones não foi analisado pelo fato de alguns serem redundantes (Tabela 6) e outros não serem passíveis de re-amplificação. A expressão diferencial dos genes pôde ser confirmada através da seleção diferencial, possibilitando identificar os clones de cDNAs presentes nas bibliotecas subtraídas que são expressos somente na resistência. A Figura 9 representa a localização dos clones de cDNAs-SSH nos macroarranjos de cDNAs. Os resultados obtidos com os macroarranjos de cDNAs podem ser visualizados nas Figuras 10, 11, 12, 13 e 14. As membranas representadas pelos números 1 e 2 contêm os clones de cDNAs-SSH, além de um cDNA de actina, ambos em duplicatas. O cDNA de actina foi utilizado como controle constitutivo, em cada membrana, e está localizado nas posições H-11 e H-12 das Figuras representadas pelo número 1 e H-3 e H-4 das Figuras representadas pelo número 2. Foi utilizado também uma sonda constitutiva de actina, cuja hibridização está representada na Figura 14.

O clone de cDNA OsR2 – A-3 e A-4, codificante da proteína dioscorina, hibridizou com duas sondas produzidas de mRNAs de plantas resistentes (C101A51 e C104LAC), podendo assim, estar relacionado à resistência, pois não apresentou sinal de hibridização com as sondas produzidas através de mRNA de plantas suscetíveis e de

plantas tratadas com H₂O (Figuras 10 - B1 e C1; 11 - B1 e C1), nem com a sonda de actina (controle positivo) (Figura 14 - A1 e A2).

Os clones OsR18, que codifica para uma proteína não conhecida (A1 – A-11 e A-12), e OsR139, que codifica para possível proteína mio-inositol oxigenase (A2 – C-3 e C-4), apresentaram sinal de hibridização com a sonda produzida de mRNA de planta resistente e podem também estar relacionados à defesa à brusone do arroz.

O gene que codifica a proteína de membrana plasmática H⁺-ATPase induzida nas bibliotecas R2 e S2 (Tabela 6), representado nas Figuras 10 – A1 e 11 - A1, localizações E3 e E4 (OsR67), também hibridizou com as sondas produzidas de mRNAs de plantas resistentes e pode ser utilizado em estudos futuros.

O clone OsR90, que está relacionado com um grupo de proteínas HMG (high-mobility group) (Figuras 10 e 11 - A1 – G-1 e G-2), apresentou hibridização com as duas sondas produzidas de mRNAs de plantas resistentes. O clone OsR99 – G-11 e G-12, codificante da enzima S-adenosil-metionina-sintetase (SAM sintetase), hibridizou com as sondas produzidas de mRNAs de plantas resistentes (C101A51 e C104LAC), representadas nas Figuras 10 – A1 e 11 –A1, e de plantas suscetíveis (Figura 10 – B1), mas com intensidades diferentes. Segundo as instruções do manual da Clontech (2002), intensidades maiores que 3 vezes correspondem a genes diferencialmente expressos.

O clone OsR172, responsivo somente para a condição de resistência, foi categorizado no mecanismo de transdução de sinais que codifica para a proteína fosfatase 2A (PP2A), localizado na Figura 10 - A2 – D-11 e D-12 também apresentou

sinal de hibridização com a sonda produzida de mRNA de uma planta resistente (C101A51).

O gene identificado no clone OsR95, que codifica transaldolases, foi encontrado em alta redundância na biblioteca R1, e também apresentou sinal de hibridização com a sonda produzida de mRNA induzido em uma planta resistente (Figura 10 - A1 - G-5 e G-6), comprovando possivelmente seu envolvimento com as espécies de ROS e com a detoxificação celular. De forma similar, foi identificado também na biblioteca R1, o clone OsR192, que é um fator de transcrição da família GRAS, o qual apresentou homologia com a proteína Scarecrow e hibridizou com a sonda produzida de mRNA de uma planta resistente (Figura 10 - A2 - F-3 e F-4). As proteínas da família GRAS são consideradas fatores de transcrição e podem estar envolvidas em processos de desenvolvimento e de defesa induzidos por elicitores químicos. Esses clones envolvidos na defesa à brusone do arroz que não hibridizaram com as sondas controle e as sondas produzidas de mRNAs de plantas resistentes podem ser candidatos a estudos futuros e assim promissores para a obtenção de resistência de espectro amplo à brusone do arroz.

No entanto, em nenhum dos 90 clones cDNAs-SSH (Figuras 12 e 13) avaliados por macroarranjos de cDNAs quando as sondas foram sintetizadas com o mRNA da série de cultivares, não foi possível verificado sinal de hibridização. Isso leva a indícios de que as respostas de defesa induzidas nas NILs são distintas das respostas induzidas nas cultivares. A única exceção é o clone OsR164 que codifica para a pequena subunidade da ribulose bifosfato carboxilase (Figura 10 - A2, B2, C2, D1 e D2 e Figura 13 - B2, D1 e D2). Os clones que hibridizaram com as sondas produzidas por plantas induzidas na resistência de forma similar às sondas controles (diferença na

intensidade de sinal menor que 3 vezes), representam os cDNAs presentes em plantas não induzidas à resistência, não sendo, portanto, considerados diferencialmente expressos.

Os resultados do presente estudo indicam a existência de uma rede complexa de interações regulatórias que ocorrem durante a resposta de defesa. Alguns dos clones obtidos pela técnica de SSH apresentaram expressão diferencial, dessa forma, esses clones podem ser utilizados para estudos futuros, para a obtenção de plantas transgênicas ou para serem utilizados como marcadores moleculares funcionais na busca de uma resistência de amplo espectro à brusone do arroz.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			OsR2									OsR18
B												
C												
D												
E			OsR67									
F												
G	OsR90				OsR95							OsR99
H												Actina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			OsR139									
	OsR164											OsR172
			OsR192									
			Actina									

FIGURA 9. Esquema da localização dos clones de cDNAs-SSH nos macroarranjos de cDNAs. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

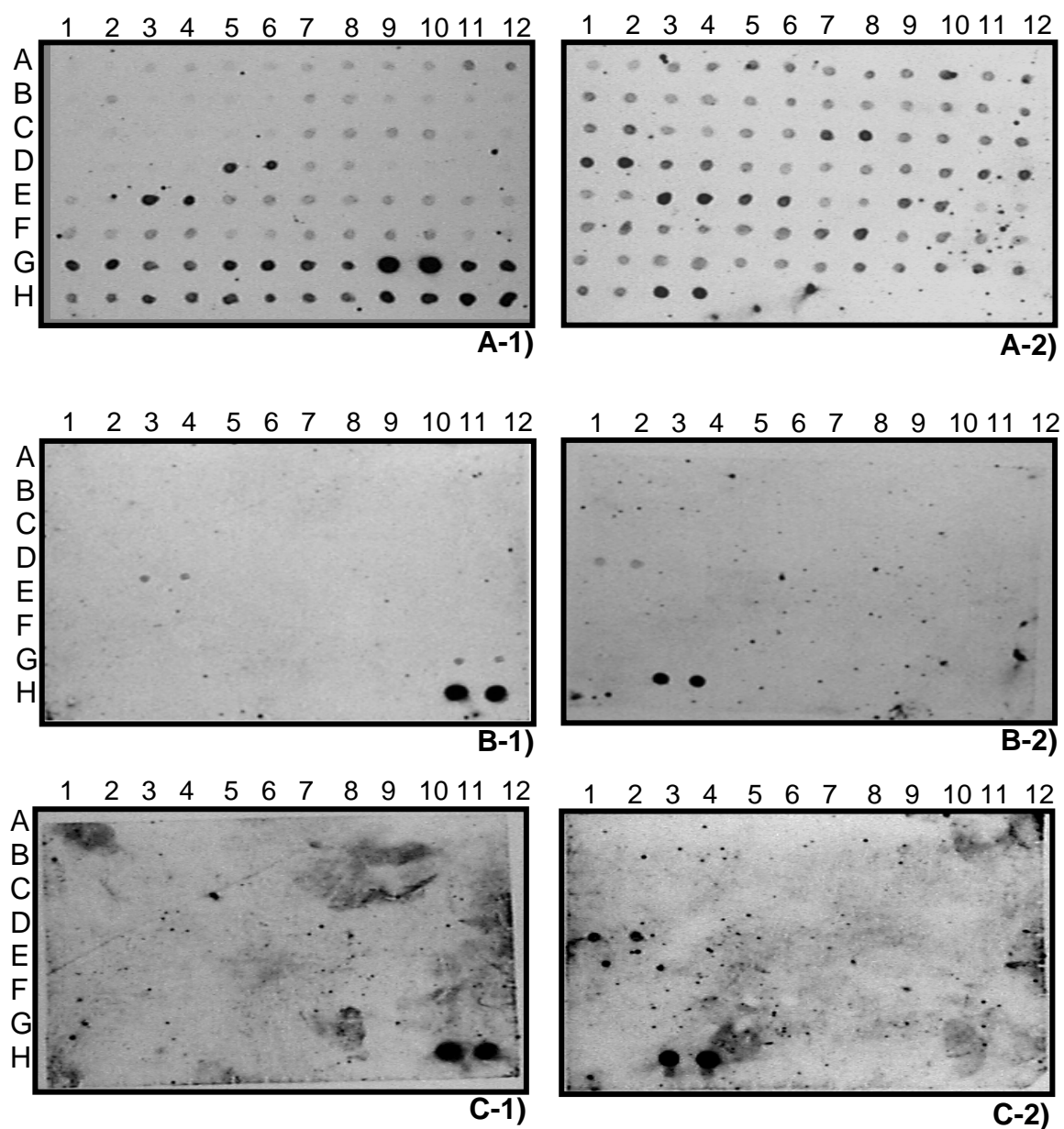


FIGURA 10. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-C101A51-R; B1 e B2 com a sonda de cDNA-C101A51-S e C1 e C2, com a sonda controle negativo C101A51-H₂O. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

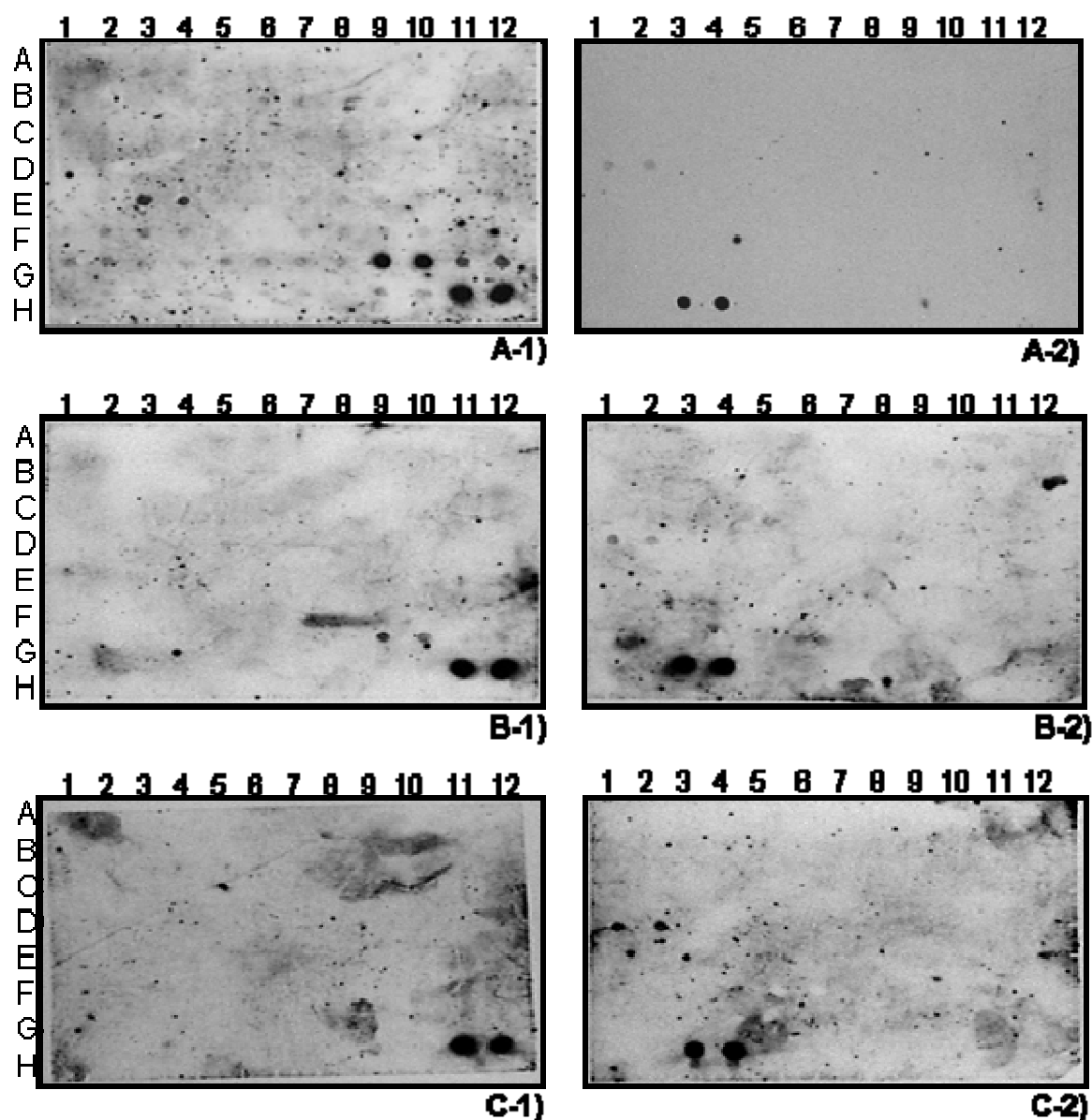


FIGURA 11. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-C104LAC-R; B1 e B2 com a sonda de cDNA-C104LA-S e C1 e C2, com a sonda controle negativo C104LAC-H₂O. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

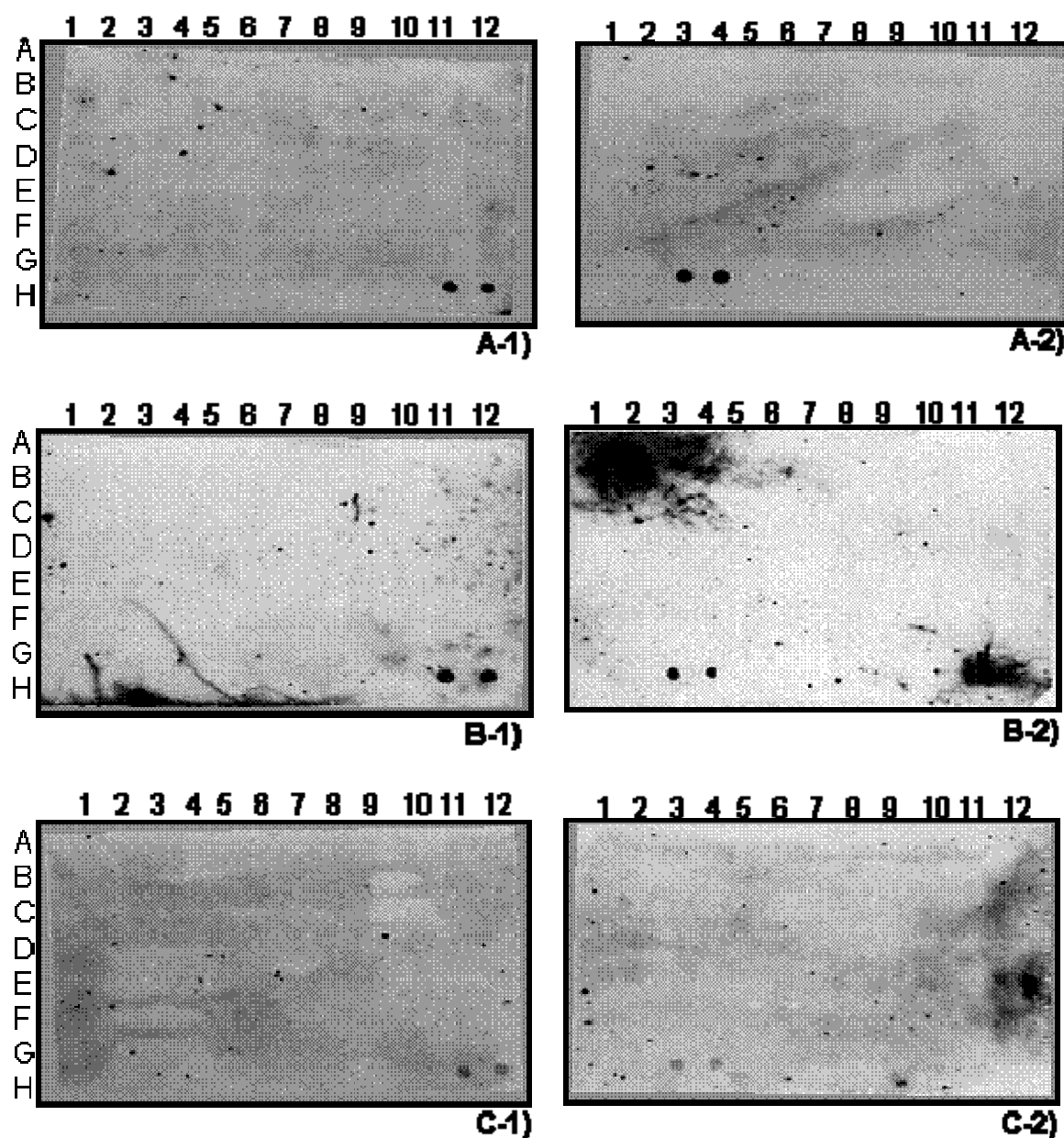


FIGURA 12. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-BR IRGA 410-R; B1 e B2 com a sonda de cDNA-IRGA 417-R e C1 e C2, com a sonda de cDNA-IRGA 420-R. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

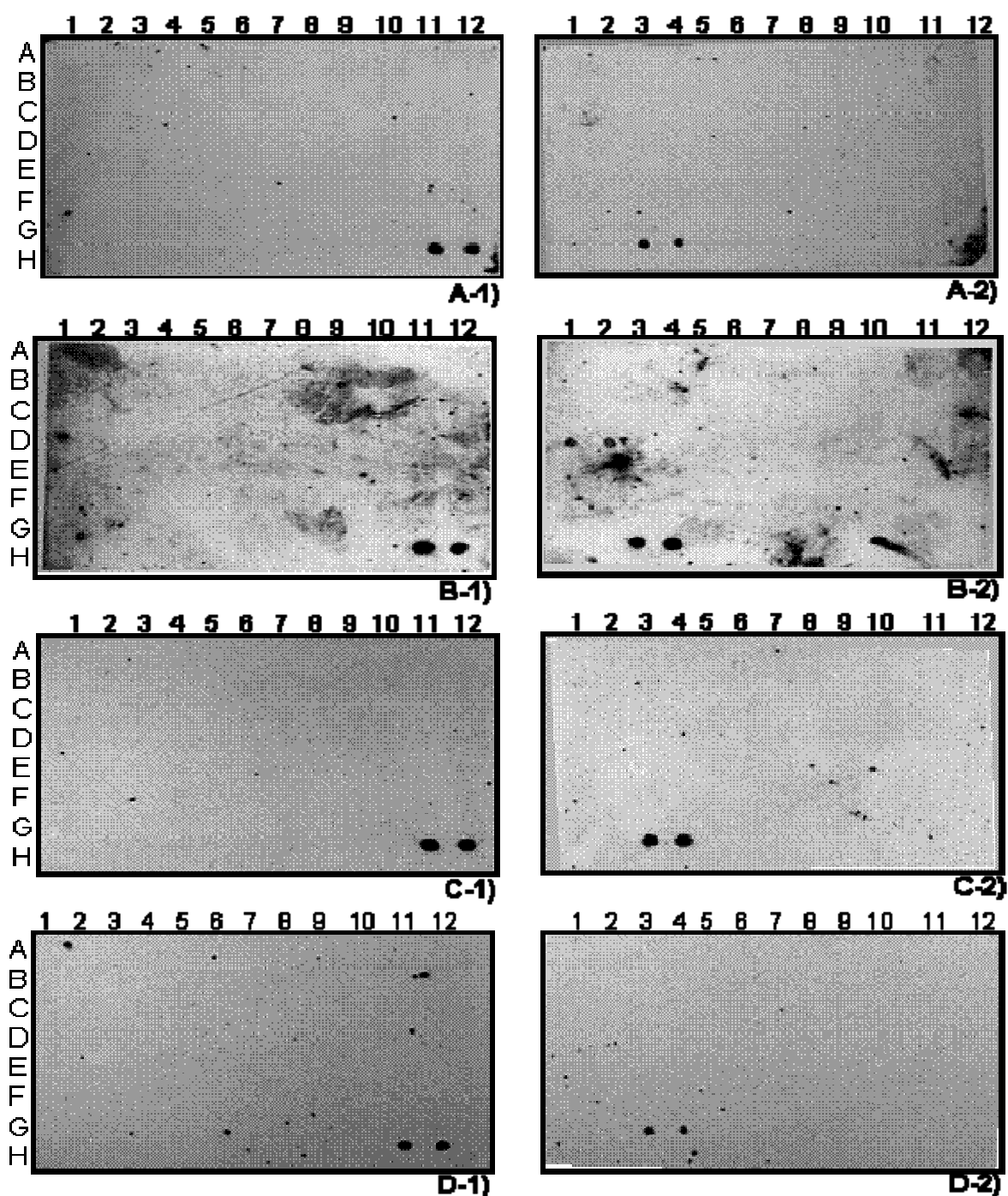


FIGURA 13. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com a sonda de cDNA-Fanny-S; B1 e B2 com a sonda de cDNA-Fanny-H₂O; C1 e C2, com a sonda de cDNA-Oryzica Llanos 5-R e D1 e D2, com a sonda cDNA-Oryzica Llanos 5-H₂O. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

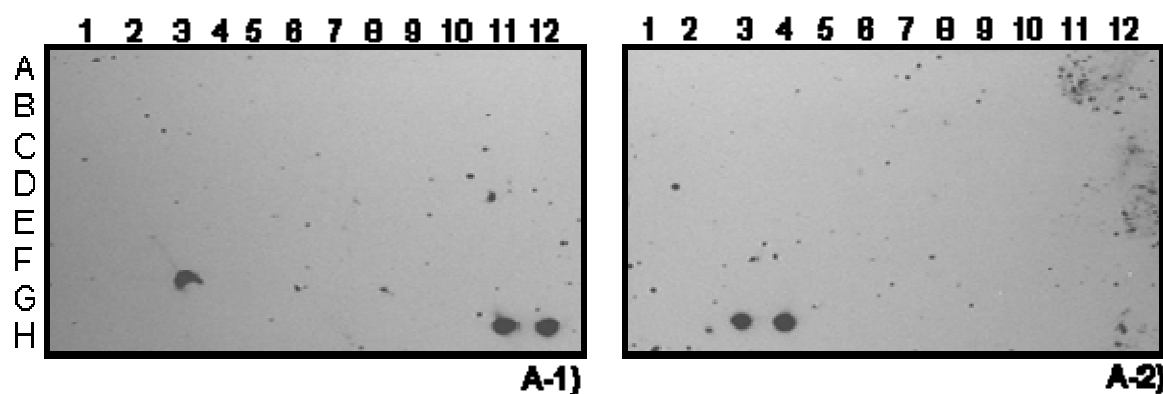


FIGURA 14. Macroarranjos de cDNAs. Seleção diferencial dos clones de cDNAs-SSH das bibliotecas R1, S1, R2 e S2. A1 e A2 representam os 90 clones hibridizados com uma sonda controle de expressão constitutiva. LFM/UFRGS, Porto Alegre, 2005.

6. CONCLUSÕES

Na interação entre *Magnaporthe grisea* e arroz foi possível verificar:

- 1) a utilização de NILs de arroz é uma ferramenta importante para a identificação dos produtos dos genes de defesa envolvidos na resistência;
- 2) a técnica de cDNA-AFLP não é suficiente para identificar proteínas codificadas por cDNAs diferencialmente expressos em larga escala;
- 3) a técnica de SSH é eficiente para identificar proteínas codificadas por genes diferencialmente expressos;
- 4) não foi possível identificar cDNAs das NILs diferencialmente expressos na série de cultivares avaliados;
- 5) nas condições do trabalho, não ocorreu a expressão coordenada de genes de resistência, mas sim, a existência de uma rede complexa e diversa de genes relacionados à defesa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.D.; KERLAVAGE, A.R.; FLEISCHMANN, R.D. et al. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of Cdna sequence. **Nature**, London, v. 377 (suppl): 3-174, 1995.

AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; RAKWAL, R. A novel rice (*Oryza sativa* L) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. **Biochememical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 274, p. 157-165, 2000a.

AGRAWAL, G.K.; RAKWAL,R.; JWA, N.S. Rice (*Oryza sativa* L) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with lights signals. **Biochememical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 278, p. 290-298, 2000b.

AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; JWA, N.-S.; AGRAWAL, V.P. Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidases (*OsPHGPX*) gene in seedling leaves. **Gene**, Amsterdam, v. 283, p. 227-236, 2002.

AGRAWAL, K.G.; JWA, N.; IWASHASHI, H. Importance of ascorbate peroxidases *OsAPX1* and *OsAPX2* in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. **Gene**, Amsterdam, v. 322, p. 93-103, 2003.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9, p. 208-219, 1991.

AUSTIN, M.J.; MUSKETT, P.; KAHN, K. et al. Regulatory role of *SGT1* in early *R* gene – mediated plant defenses. **Science**, Washington, v. 295; p. 2077-2079, 2002.

AYLIFFE, A.M.; LAGUDAH, S.E. Molecular genetics of resistance in cereals. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, p. 765-773, 2004.

AZAMBUJA, I.H.V.; VERNETTI, JR.F. de J.; MAGALHÃES, JR.A.M. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES, JR.A.M. (Ed.) ARROZ irrigado no Sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 23-44.

BACHEM, C.W.B.; van der HOEVEN, R.S.; de BRUIJN, S.M. et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 745-753, 1996.

BACHEM, C.W.B.; OOMEN, R.J.F.J.; VISSER, R.G.F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 16, p. 157-173, 1998.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICA, B. et al. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, Washington, v. 276, p. 726-733, 1997.

BANKI, K.; HUTTERS, E.; COLOMBO, E. et al. Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 51, p. 32994-330001, 1996.

BARR, M.E. *Magnaporthe*, *Telimebella*, and *Hyponectria* (Physosporiaceae). **Mycologia**, New York, v. 69, p. 952-966, 1977.

BEDENDO, I.P. Manchas foliares. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Esalq, 1997. p. 848-858.

BERRUYER, R.; ADREIT, H.; MILAZZO, J. et al. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 1139-1147, 2003.

BOLLE, C.; KONCZ, C.; CHUA, N-H. PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. **Genes & Developmental**, New York, v. 14, p. 1269-1278, 2000.

BONMAN, J.M. Durable resistance to rice blast disease – environmental influences. **Euphytica**, Wageningen, v. 63, p. 115-123, 1992.

BONMAN, J.M.; MACKILL, D.J. Durable resistance to rice blast disease. **Oryza** [S.I.], v. 25, p. 103-110, 1988.

BORROMEO, E.S.; NELSON, R.J.; BONMAN, J.M. et al. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 393-399, 1993.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. de C. Eds. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. 309p.

BREUSEGEM, F.V.; DEKEYSER, R.; GIELEN, J. et al. Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 105, p. 1463-1464, 1994.

BRUGGMANN, R.; ABDERHALDEN, O.; REYMOND, P. et al. Analysis of epidermis- and mesophyll-specific transcript accumulation in powdery mildew-inoculated wheat leaves. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, p. 247-267, 2005.

BRYAN, G.T.; WU, K.; FARRAL, L. et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 2033-2045, 2000.

BUGOS, R.C.; CHIANG, V.I.; ZHANG, X.H. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, Natick, v. 19, n.5, p. 734-737, 1995.

CARMONA, P.S.; TERRES, A.L.; SCHIOCCHET, M. Avaliação Crítica dos Projetos do PNP-Arroz na Área de Melhoramento Genético, no período de 1980 a 1990: Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **A pesquisa de arroz no Brasil nos anos 80: avaliação crítica dos principais resultados**. Goiânia, 1994. p. 269-275. (Documentos, 40).

CASTRO, E.M.de.; BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P.H.N. et al. Melhoramento do Arroz. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999.

CAUSSE, M.A.; FULTON, T.M.; CHO, Y.G. et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interespecific backcross population. **Genetics**, Baltimore, v. 138, p. 1251-1274, 1994.

CHAUHAN, S.; FARMAN, M.L.; ZHANG, H.B. et al. Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVR-CO39* of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics**. Berlin, v. 267, p. 603-612, 2002.

CHEN, D-H.; ZEIGLER, R.S.; AHN, S.W. et al. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi-2* (t). **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 1, p. 52-56, 1996.

CHEN, M.; PRESTING, G.; BARBAZUK, W.B. et al. An integrated physical and genetic map of the rice genome. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 537-545, 2002.

CHEN, S.; WANG, L.; QUE, Z. et al. Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin. 2005. *In press*.

CLONTECHniques, Powerful, reproducible enrichment of differentially expressed genes. [S.I.], 1995. p. 2-5.

CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual. [S.I.], 2002. p. 1-47.

COOKE, M.C.; ELLIS, J.B. New Jersey fungi. **Grevillea**, [S.I.], v. 8, p. 11-16, 1879.

COOPER, B.; CLARKE, J.D.; BUDWORTH, P. et al. A network of rice genes associated with stress response and seed development. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 4945-4950, 2003.

CORREA-VICTORIA, F.; ZEIGLER, R.S. Desarrollo de resistencia estable a *Pyricularia grisea*. In: TALLER INTERNACIONAL DE SELECCIÓN RECURRENTE EN ARROZ, 1995, Goiania. 1995. [S.I.], [1995]. p. 103-109.

COSTIGAN, C.; KOLODRUBETZ, D.; SNYDER, M. *NHP6A* and *NHP6B*, which encode HMG1- like proteins, are candidates for downstream components of the yeast *SLT2* mitogen-activated protein kinase pathway. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 14, n. 4, p. 2391-2403, 1994.

COUCH, B.C.; FUDAL, I.; LEBRUN, M-H. et al. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. **Genetics**, Baltimore, v. 170, p. 613-630, 2005.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-interactions. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1793-1807, 1996.

DAY, R.B.; TANABE, S.; KOSHIOKA, M. et al. Two rice *GRAS* family genes responsive to *N*-acetylchitoooligosaccharide elicitor are induced by photoactive gibberellins: evidence for cross-talk between elicitor and gibberellin signaling in rice cells. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 0, p. 1-12, 2004.

DELANEY, T.P. Genetic dissection of acquired resistance disease. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 113, p. 5-12, 1997.

DEMPSEY, D.M.A.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, p. 547-575, 1999.

DESAI, S.; HILL, J.; TRELOGAN, S. et al. Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization. In: FERREIRA, H.B.; ZAHA, A.; SOGAYAR, M.C. (Eds). **Construção e caracterização de bibliotecas subtraídas e normalizadas**. Porto Alegre : [s.n.], 1996. p. 81-112.

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

DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H.; SCHMIDT, R. et al. A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 685-694, 1997.

DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 339-367, 1990.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 479-501, 1994.

DURRANT, W.E.; ROWLAND, O.; PIEDRAS, P. et al. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 963-977, 2000.

ECKEY, C.; KORELL, M.; LEIB, K. et al. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 1-15, 2004.

EMBRAPA. **Arroz irrigado**: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Pelotas, 1999. p. 74-80.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão **[Informações]**. Disponível em: www.cnpaf.embrapa.br/.../brusone.htm. Acesso em: nov. 2005.

FAO.**[Informações]**. Disponível em: www.faostat.fao.org. Acesso em: nov. 2005.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, n. 8, p. 653-669, 1942.

GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Plant comparative genetics after 10 years. **Science**, Washington, v. 282, p. 656-659, 1998.

GALINDO, J.E.; POIRIER, G.M.-C.; GUO, H. et al. Differential display of RNA. In: ANOLLÉS, G.C.; GRESSHOFF, P.M. (Eds) **DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews**. New York: Willey-VCH, 1998. p. 225-236.

GANESAN, V.; THOMAS, G. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. **Plant Science**, Shannon, v. 160, p. 1095-1106, 2001.

GOFF, S.A.; RICKE, D.; LAN, T-H. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, Washington, v. 296, p. 92-100, 2002.

GROSS, J.; STEIN, R.J.; FETT-NETO, A.G.. et al. Iron homeostasis related genes in rice. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 477-497, 2003.

HALL, A.; ZERIAL, M. Overviews of the Ras superfamily of small GTPases. In: ZERAIL, M.; HUBER, L.A. (Eds). **Guidebook to the small GTAPases**. Oxford : Oxford University Press, 1995. p.3-11.

HAMER, J.E.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G. et al. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v. 239, p. 288-290, 1988.

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

HANCOCK, J.T.; HENSON, D.; NYIRENDA, M. et al. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 828-835, 2005.

HARUSHIMA, Y.; YANO, M.; SHOMURA, A. et al. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. **Genetics**, Baltimore, v. 148, p. 479-494, 1998.

HE, C.; FONG, S.H.T.; YANG, D.; WANG, G.-L. BWMK1, a novel MAP Kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 12, p. 1064-1073, 1999.

HEBERT, T.T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 83-87, 1971.

HERMS, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H. et al. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. **Plant Physiology**, Lancaster, v.130, p.120-127, 2002.

HOU, W-C.; LIU, J-S.; CHEN, H-J. et al. Dioscorin, the major tuber storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) with carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 2168-2172, 1999.

HOU, W-C.; LEE, M-H.; CHEN, H-J. et al. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 4956-4960, 2001.

HOWARD, R.J. Cell biology of pathogenesis. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds.). **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p. 03-22.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A.; ROACH, D.H. et al. Penetration of hard substrates by fungus employing enormous turgor pressures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 11281-11284, 1991.

HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-512, 1996.

HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 5640-5648, 1994.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, Cambridge, v. 80, p. 225-236, 1995.

IBGE. **[Informações]**. Disponível em: www.ibge.gov.br/. Acesso em: nov. 2005.

IGARASHI, S.; UTIAMADA, C.M.; IGARASHI, L.C. et al. *Pyricularia* em trigo. 1º Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 351-352, 1986.

IRRI. **Standard evaluation system for rice**. Manilla: INGER/Genetic Resources Center, 1996. 52p.

IRGA. **Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil** / IRGA. Porto Alegre: IRGA, 2001. 128p.

IRGA. **[Informações]**. Disponível em www.irga.rs.gov.br. Acesso em: nov. 2005a.

IRGA. **Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil** / IRGA. Santa Maria: UFSM, 2005b. 159p.

IVASHUTA, S.; IMAI, R.; UCHIYAMA, K.; et al. The coupling of differential display and AFLP approaches for nonradioactive mRNA fingerprinting. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.12, p.137-141, 1999.

JANTASURIYARAT, C.; GOWDA, M.; HALLER, K.; et al. Large-scale identification of expressed sequences tags involved in rice and rice blast fungus interaction. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, p. 105-115, 2005.

JEONG, M.-J.; PARK, S.-C.; KWON, H.-B. et al. Isolation and characterization of gene encoding glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 278, p. 192-196, 2000.

JIA, Y.; McADAMS, S.A.; BRYAN, G.T. et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **The EMBO Journal**, Oxford, n. 15, v.19, p. 4004-4014, 2000.

JIANG, J.; WANG, S. Identification of a 118-kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene *Pi-2(t)* in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 268, p. 249-252, 2002.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 309-330, 1984.

JUNG, Y.-H.; LEE, J.-H.; AGRAWAL, G.K. et al. The rice (*Oryza sativa*) Blast Lesion Mimic, *blm₃*, may confer resistance to blast pathogens by triggering multiple defense-associated signaling pathways. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 397-406, 2005.

KANZAKI, H.; NIRASAWA, S.; SAITOH, H. et al. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, p. 809-814, 2002.

KATO, C.; MIZUTANI, T.; TAMAKI, H. et al. Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 320-331, 2004.

KAWALLECK, P.; PLESCH, G.; HAHLBROCK, K. et al. Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 4713-4717, 1992.

KIM, C.Y.; LEE, S.-H.; PARK, H.C. et al. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 4, p. 470-474, 2000.

KIM, H.S.; DELANEY, T.P. Arabidopsis SON11 is an F-Box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1469-1482, 2002.

KIM, J. H.; LEE, S.; PARK, J. B. et al. Hydrogen peroxide induces association between glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phospholipase D2 to facilitate phospholipase D2 activation in PC12 cells **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 85, p. 1228-1236, 2003.

KIM, S.; AHN, II-P.; LEE, Y-H. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 11, p. 1340-1346, 2001.

KINOSHITA, T. Report of committee on gene simbolization, nomenclature, and linkage groups. **Rice Genetics Newsletter**, Manila, v.8, p.02-37, 1991.

KUHN, E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, p. 139-155, 2001.

KUMAR, J.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S. population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. **Genetics**, Baltimore, v. 152, p. 971-984, 1999.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LAMB, C.; LAWTON, M.A.; DRON, M. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v. 56, p. 215-224, 1989.

LEE, M.-W.; QI, M.; YANG, Y. A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 4, p. 527-535, 2001.

LI, W.L.; FARIS, J.D.; MUTHUKRISHNAN, S. et al. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 353-362, 2001.

LI, X.; QIAN Q.; FU, Z. et al. Control of tillering in rice. **Nature**, London, v. 422, p. 618-621, 2003.

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

LING, K.C.; OU, S.H. Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p. 339-342, 1968.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, Washington, v. 259, p. 946-951, 1993.

LIU, B.; ZHANG, S.; ZHU, X. et al. Candidate defense genes as predictors of quantitative blast resistance in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1146-1152, 2004.

LIU, X.Q.; WANG, L.; CHEN, S. et al. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, 2005a. *In press*

LIU, G.; SHENG, X.; GREENSHIELDS, D.L. et al. Profiling of wheat class III peroxidases genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 7, p. 730-741, 2005b.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. *myo*-inositol metabolism in plants. **Plant Science**, Shannon, v. 150, p. 1-19, 2000.

LOPES, S.I.G. Arroz Irrigado: situação atual e perspectivas de uso de cultivares híbridas, transgênicas e mutadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24., 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2005. p. 594 - 609.

LORENCE, A.; CHEVONE, B.I.; MENDES, P.; NESSLER, C.L. *myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, p. 1200-1205, 2004.

LU, B.R. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): historical perspective and current status. **International Rice Research Institute**, Los Baños, Notes, v. 24, p. 4-8, 1999.

LU, G.; JANTASURIYARAT, C.; ZHOU, B. et al. Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 525-534, 2004.

LUZ, W.C. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte II – Classificação dos fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 1-62, 2001.

MACIEL, J.L.N.; MENEZES, V.G.; RAMIREZ, H. et al. Ocorrência do vírus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ; REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 7., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2002. p. 491-492.

MACIEL, J.L.N.; RODRIGUES, P.C.S.; AVOZANI, O.A. et al. Padrão molecular e de virulência de isolados de *Pyricularia grisea* do estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 504-510, 2004.

MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. New hosts of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 125-127, 1986.

MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 746-749, 1992.

MALKIN, R.; NIYOGI, K.; Photosynthesis. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 568-628.

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

MASMOUDI, K.; BRINI, F.; HASSAIRI, A. et al. Isolation and characterization of a differential display expressed sequence tag from *Triticum aestivum* salt-stressed roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 971-979, 2001.

MATSUMURA, H.; REICH, S.; ITO, A. et al. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by super-sage. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15718-15723, 2003.

MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F. et al (Eds.) **Science of the Rice Plant**, Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v.3: Genetics.

McCOUCH, S.R.; NELSON, R.J.; THOME, J. et al. Mapping of blast resistance genes in rice. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds.). **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p. 167-186.

McCOUCH, S.R.; TEYTELMAN, L.; XU, Y. et al. Development and mapping new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, Oxford, v. 9, p. 257-279, 2002.

McELROY, D.; ROTHENBERG, M.; WU, R. Structural characterization of a rice actin gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 163-171, 1990.

McGREE, J.D.; HAMMER, J.E.; HODGES, T.K. Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 7, p. 877-886, 2001.

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; PHROMRAKSA, T.; ZEIGLER, R.S. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 10, p. 939-943, 1999.

MEKWATANAKARN, P.; KOSITRATANA, W.; LEVY, M.; ZEIGLER, R.S. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice near-isogenic for major resistance genes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 1, p. 60-70, 2000.

MOODY, D.E. Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. **Journal of Animal Science**, Savoy, (E.Suppl.) E.128-E135, 2001.

MORAES, M.G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, 1998.

MURPHY, A.; TAIZ, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, p. 945-954, 1995.

NISHIZAWA, Y.; NISHIO, Z.; NAKAZONO, K. et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 383-390, 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

ORBACH, M.; FARRALL, L.; SWEIGARD, J.A. et al. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, p.2019-2032, 2000.

OU, S.H. Fungus diseases – foliage diseases. In: RICE disease. England : CAB, 1972a. p. 97-184.

OU, S.H. **Rice diseases**. London: Eastern Press 1972b, p.97-137.

OU, S.H. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 167-187, 1980.

OU, S.H. A Proposal for an International Program of Research on the Rice Blast Disease. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds.) **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1985. p. 109-201.

PARLEVLIT, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance private. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas. **Palestras...**Viçosa: UFV/SBF, 1997. p. 7-15.

PEART, J.R.; LU R.; SADANANDOM, A. et al. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 16, p. 10865-10869, 2002.

PENG, J.; KONONOWICZ, H.; HODGES, T.K. Transgenic indica rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 855-863, 1992.

PICKART, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 503-533, 2001.

POWELL, R.; GANNON, F. **Addition of linkers/adaptors to blunt-end DNA fragments**. Disponível em: <http://home.uchicago.edu/~bchen2/PAS11>. Acesso em: mar. 2001.

PRABHU, A.S.; GUIMARÃES, C.M.; SILVA, G.B. **Manejo da brusone no arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2002.

RATHJEN, J.P.; MOFFETT, P. Early signal transduction events in specific plant disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 300-306, 2003.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 123-130, 2003.

REYMOND, P. DNA microarrays and plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 313-321, 2001.

RICHARDS, D.E.; PENG, J.; HARBERD, N.P. Plant GRAS and metazoan STATs: one family? **BioEssays**, New York, v. 22, p. 573-577, 2000.

ROCA, W.; CORREA-VICTORIA, F.; MARTÍNEZ, C. et al. Developing durable resistance to rice blast: productivity and environmental considerations. In: INTERNATIONAL SERVICE FOR NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH (ISNAR). **Biotechnology Seminar Paper**. [S.l.], 1996. p. 74-80.

RODRIGUES, P.L. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 919-927, 1998.

ROSSMAN, A.Y.; HOWARD, R.J.; VALENT, B. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. **Mycologia**, New York, v. 84, n. 4, p. 509-512, 1990.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SALLAUD, C.; LORIEUX, M.; ROUMEN, E. et al. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistance rice variety IR64 using a QTLs mapping strategy. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 794-803, 2003.

SAKAMOTO, K.; TADA, Y.; YOKOZEKI, Y. et al. Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, p. 847-855, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: MOLECULAR Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. v. 1, 2, 3.

SANO, H.; YOUSSEFIAN, S. A novel *ras*-related *rpg1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 228, p. 227-232, 1991.

SASAKI, T.; MATSUMOTO, T.; BABA, T. et al. The international rice genome sequencing project: progress and prospects. In: KHUSH, G.S.; BRAR, D.S.; HARDY, B. (Eds) **Rice Genetics IV**. New Delhi (India): Science Publishers: IRRI – International Rice Research Institute. 488p. Proceedings of the Fourth International Rice Genetics Symposium, 22-27 October 2000, Los Baños, Philippines

SAWADA, K.; HASEGAWA, M.; TOKUDA, L. et al. Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing *OsSBP*, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, p. 873-880, 2004.

SCHAFFRATH, U.; ZABBAI, F.; DUDLER, R. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 267, p. 5935-5942, 2000.

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

SCHERER, N.M.; THOMPSON, C.E.; FREITAS, L.B. et al. Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 4, p. 645-653, 2005.

SCHEUERMANN, K.K. **Análise da variabilidade genética de *Magnaporthe grisea* no Estado de Santa Catarina**. 2002. 74f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SESMA, A.; OSBOURN, A.E. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental process typical of root-infecting fungi. **Nature**, London, v. 431, p. 582-586, 2004.

SHEWRY, P.R. Tuber storage proteins. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, p. 755-769, 2003.

SHOHAM, N.G.; ARAD, T.; ROSIN-ABERSFELD, R. et al. Differential display assay and analysis. In: PARDEE, A.B.; McCLELLAND, M. (Eds). **Expression Genetics: Differential Display**. Natick: BioTechniques, 1999. p. 211-213. (Update Series)

SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; RODRIGUES, R.L.; GERHARDT, L.B.A. et al. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP techniques during heat stress in cowpea nodules. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 515, p. 44-50, 2002.

SLAYMAKER, D.H.; NAVARRE, D.A.; CLARK, D. et al. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 18, p. 11640-11645, 2002.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 229-235, 2000.

SOMSSICH, I.E. MAP Kinase and plant defence. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, p. 406-408, 1997.

SONG, F.; GOODMAN, R.T. Molecular biology of disease resistance in rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 1-11, 2001.

SONG, F.; GOODMAN, R.M. Molecular cloning and characterization of a rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene, *OsPI-PLC1*, that is activated in systemic acquired resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 31-40, 2002.

STONE, S.L.; HAUKSDÓTTIR, H.; TROY, A. et al. Functional analysis of the RING-Type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. **Plant Physiology**; Lancaster, v. 137, p. 13-30, 2005.

SUBRAMANIAN, B.; BANSAL, V.K.; KAV, N.N. Proteome-level investigation of *Brassica carinata*-derived resistance to *Leptosphaeria maculans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 313-324, 2005.

TAKABAYASHI, N.; TOSA, Y.; OH, H.S. et al. A gene-for-gene relationship underlying the species-species parasitism of *avena/triticum* isolates of *Magnaporthe grisea* on wheat cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 11, p. 1182-1187, 2002.

TAKAHASHI, A.; KAWASAKI, T.; HENMI, K. et al. Lesion mimic of rice with alterations in early signaling events of defense. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 5, p.535-545, 1999.

TALBOT, N.J. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 177-202, 2003.

THE RICE FULL-LENGTH cDNA CONSORTIUM. Colelection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. **Science**, Washington, v. 301, p. 376-379, 2003.

TONGEN, A.; GORIELY, A.; TABOR, M. Biomechanical model for apressorial design in *Magnaporthe grisea*. **Journal of Theoretical Biology**, London, 2005. (Article in Press).

TUITE, J. Plant Pathological Methods. **Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess Publishing, 1969.

UMEMURA, K.; OGAWA, N.; SHIMURA, M. et al. Possible role of phytocassane, rice phytoalexin, in disease resistance of rice against the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, p. 899-902, 2003.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, p. 245-265, 1994.

VATANAIBOON, P.; VARALUKSIT, T.; SEEANUKUN, C. et al. Transaldolase exhibits a protective role against menadione toxicity in *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 297, p. 968-973, 2002.

VAUGHAN, D.A. **The wild relatives rice**: A genetic resources handbook. Manila: IRRI, 1994. 137p.

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

VERA-ESTRELA, R.; BLUMWALD, E.; HIGGINS, V.J. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, p. 1208-1215, 1992.

VERA-ESTRELA, R.; BARKLA, B.J.; HIGGINS, V.J. et al. Plant defense response to fungal pathogens. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, p. 209-215, 1994.

VIJI, G.; GNANAMANICKAM, S.S. Mating type distribution and fertility status of *Magnaporthe grisea* populations from various hosts in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 1, p. 36-49, 1998.

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

VUYLSTEKE, M.; DAELE, H.V.D.; VERCAUTEREN, A. et al. Genetic dissection of transcriptional regulation by cDNA-AFLP. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 439-446, 2006.

WALDEN, A.R.; WALTER, C.; GARDNER, R.C. Genes expressed in *pinus radiata* male cone include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, p. 1103-1116, 1999.

WANG, G.L.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M. et al. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar, **Genetics**, Baltimore, v. 136, p. 1421-1434, 1994.

WANG, Z.X.; YANO, M.; YAMANOUCHI, U. et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **The Plant Journal**, Oxford, v.19, n.1, p.55-64, 1999.

WATANABE, Y. Genomic Constitution of genus *Oryzica*. Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryzica*. In.: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Eds). **Science of the Rice Plant Genetics**, Tokyo: Food and agricultural Policy Research Center, 1997. v. 3, p. 29-68.

WEBSTER, R.K.; GUNNELL, P.S. **Compendium of Rice Disease**. Saint Paul: APS PRESS, 1992. 62p.

WU, J.; MAEHARA, T.; SHIMOKAWA, T. et al A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 525-535, 2002.

WU, J.-L.; FAN, Y.-Y.; LI, D.-B. et al. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 50-56, 2005.

XIONG, L.; LEE, W.M. QI, M. et al. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 685-692, 2001.

XU, L.; LIU, F.; LECHNER, E. et al. The SCF^{COL1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1919-1935, 2002.

XU, Y.; McCOUCH, S.R.; ZHANG, Q. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, p. 7-26, 2005.

YODA, H.; SANO, H. Activation of hypersensitive response genes in the absence of pathogens in transgenic tobacco plants expressing a rice small GTPase. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 993-997, 2003.

YU, J.; HU, S.; WANG, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, Washington, v. 296, p. 79-91, 2002.

YU, J.; WANG, J.; LIN, W. et al. The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 3, p. 266-281, 2005.

YUN, D.J.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Plant antifungal proteins. **Plant Breeding Reviews**, Westport, v. 14, p. 39-88, 1997.

ZEIGLER, R.S.; CUOC, L.X.; SCOTT, R.P. et al. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology**, v. 85, n. 4, p. 443-451, 1995.

ZEIGLER, R.S.; TOHME, J.; NELSON, R. et al. Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds.). **Rice blast disease**. Manila: Cab International, 1994. p. 268-292.

ZHENG, X; CHEN, X.; ZHANG, X. et al. Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, p. 99-109, 2004.

ZHENG, Z.; UCHACZ, T.M.; TAYLOR, J.L. Isolation and characterization of novel defence-related genes induced by copper, salicylic acid, methyl jasmonate, abscisic acid and pathogen infection in *Brassica carinata*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 159-169, 2001.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Composição do meio de cultura SAP (sólido de arroz polido)

Componentes	Quantidades para 1 L
Farelo de arroz	1,5 g
Extrato de levedura	2,5 g
Sacarose	4,0 g
Agar	1,5 g

Esterilizar por a 120 °C por 20 min. Fonte: Tuite (1969).

APÊNDICE 2. Composição do meio de cultura LB (Lúria-Bertani) líquido

Componentes	Quantidades para 1 L
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g

O pH do meio deve ser ajustado para 7,5 com NaOH 0,1 N e esterilizar por a 120 °C por 20 min. Fonte: Brasileiro e Carneiro, 1998.

APÊNDICE 3. Composição do meio de cultura LB (Lúria-Bertani) sólido

Componentes	Quantidades para 1 L
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Agar	16 g

O pH do meio deve ser ajustado para 7,5 com NaOH 0,1 N e esterilizar por a 120 °C por 20 min. Fonte: Brasileiro e Carneiro, 1998.

9. VITA

Caren Regina Cavichioli Lamb, filha de Sergio Cavichioli e de Marinez Peruzzo Cavichioli, nasceu em 12 de novembro de 1972, no município de Tapejara, RS.

Em 1992 ingressou no Curso de Ciências Biológicas, Licenciatura e Bacharelado, na Universidade de Passo Fundo, graduando-se como Bióloga em 1996. Durante os anos de 1995 e 1996, foi bolsista de Iniciação Científica da FAPERGS, atuando no Centro de Pesquisas em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo.

Entre março de 1997 e fevereiro de 1998 foi bolsista de Aperfeiçoamento no Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Em março de 1998 iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia, do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Área de Concentração Plantas de Lavoura e desenvolveu o projeto de Embriogênese Somática, Regeneração de Plantas. Desenvolveu o projeto de mestrado intitulado Transformação Genética de Genótipos Brasileiros de Aveia (*Avena sativa* L.). A conclusão do curso se deu em março de 2000.

Atuou como bolsista recém mestre do CNPq na EMBRAPA Trigo em Passo Fundo entre outubro de 2000 e março de 2002. Participando de um projeto denominado Haplodiploidização e Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético da Qualidade do Trigo Nacional.

No ano de 2002 ingressou no curso de pós-graduação em Fitotecnia da Faculdade de Agronomia, Área de Concentração Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.