



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2013
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Análise do padrão de expressão gênica de genes codificadores de quitinases em <i>Glycine max</i> frente ao estresse provocado por <i>Phakopsora pachyrhizi</i>
<b>Autor</b>	Patrícia Bays
<b>Orientador</b>	MARIA HELENA BODANESE ZANETTINI

Doenças fúngicas podem causar uma perda considerável de rendimento em lavouras. A produção de enzimas capazes de degradar e invadir as paredes celulares de fungos fitopatogênicos é um componente importante da resposta de defesa em plantas. A quitina é um formada por um polímero de cadeia longa de N-acetilglicosamina (GlcNAc), insolúvel em água e amplamente distribuída em organismos como fungos, artrópodes e nematóides. Quando plantas são infectadas por fungos, os componentes derivados da quitina da parede celular destes organismos são enzimaticamente degradados resultando na inibição do crescimento fúngico.

A ferrugem asiática é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Este é bastante agressivo e adaptado a uma ampla faixa de temperatura, o que facilitou a sua dispersão por quase toda a área produtora de soja no país. Os principais sintomas são pequenos pontos de coloração castanha a marrom que evoluem para pústulas, e que coalescem causando o amarelecimento, desfolha prematura e impedindo a plena formação dos grãos. Quanto mais cedo ocorre a infecção, menor é o tamanho dos grãos e menor o rendimento.

Com base em bancos de dados públicos de expressão gênica, foram selecionados 8 genes codificadores de quitinases em soja com expressão diferencial em ensaios de SuperSAGE. Estes genes estão distribuídos em 7 cromossomos diferentes (1, 9, 11, 15, 16, 18 e 19), sendo que no cromossomo 15 foram selecionados dois genes. Para cada um dos genes foram projetados oligonucleotídeos iniciadores para o experimento de PCR quantitativa em tempo real.

Plantas de dois genótipos de soja (Embrapa 48 e PI561356) foram submetidas ao tratamento com o fungo *P. pachyrhizi* por 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas. A fim de obtermos amostras controle para cada genótipo e tempo, as plantas foram divididas em dois grupos: inoculadas e não inoculadas (mock). Após esses tempos, as amostras foram coletadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. O RNA das amostras foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No total serão analisadas 72 amostras pertencentes a 24 tratamentos diferentes realizados em triplicatas biológicas. A síntese de cDNA foi realizada com a enzima M-MLV (Invitrogen) a partir de  $1\mu\text{g}$  de RNA. As reações de qPCR estão sendo feitas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Life Technologies), em quadruplicatas técnicas e a detecção foi feita com o corante intercalante SYBR Green. Os valores de expressão gênica relativa estão sendo calculados com base no método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  descrito por Livak & Schmittgen.

Os genes Chi16 e Chi19 foram selecionados para a clonagem e construção de vetores binários para transformação de embriões de soja. Para tanto, as regiões codificadoras (CDSs) foram amplificadas a partir de cDNA, clonadas nos vetores pGEM T-Easy e pENTR. A identidade das sequências foi confirmada por sequenciamento. Como perspectivas, pretendemos realizar a recombinação com o vetor binário pH7WG2D (resistente a higromicina) e a transformação dos embriões mantidos em cultura *in vitro*.