



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SUELLEN MIKA HISHINUMA SILVA

**EFEITO DA SUPEREXPRESSION DO GENE *GmHsp22.4* NA
RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Meloidogyne javanica* EM
SOJA E *Arabidopsis thaliana***

Londrina
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Soja

SUELLEN MIKA HISHINUMA SILVA

**EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DO GENE *GmHsp22.4* NA
RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Meloidogyne javanica* EM
SOJA E *Arabidopsis thaliana***

Londrina
2015

SUELLEN MIKA HISHINUMA SILVA

**EFEITO DA SUPEREXPRESSION DO GENE *GmHsp22.4* NA
RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Meloidogyne javanica* EM
SOJA E *Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Francismar Corrêa
Marcelino-Guimarães

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Suellen Mika Hishinuma.
Efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* na resposta a infecção por
Meloidogyne javanica em soja e *Arabidopsis thaliana* / Suellen Mika Hishinuma
Silva. – Londrina, 2015.
74 f. : il.

Orientador: Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia vegetal – Teses. 2. Nematóide de cisto da soja – Teses. 3. Soja
– Biotecnologia – Teses. 4. Genética vegetal – Teses. 5. *Meloidogyne javanica* –
Teses. 6. *Arabidopsis thaliana* – Teses. I. Marcelino-Guimarães, Francismar Corrêa.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

SUELLEN MIKA HISHINUMA SILVA

**EFEITO DA SUPEREXPRESSION DO GENE *GmHsp22.4* NA
RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Meloidogyne javanica* EM SOJA E
*Arabidopsis thaliana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Francismar Corrêa
Marcelino Guimarães
Embrapa Soja/ Universidade Estadual de
Londrina – UEL

Profa. Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo De
Carvalho
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Dr. Liliane Marcia Mertz Henning
Embrapa Soja

Londrina, 11 de março de 2015.

Aos meus pais, Celina e João, a minha irmã Ludmilla, e a todos os meus amigos que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e à Embrapa Soja, por me proporcionarem as condições necessárias para a realização deste trabalho;

À Capes, pelo apoio financeiro imprescindível;

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino Guimarães, por ter me recebido no laboratório de Biotecnologia Vegetal com muito carinho, pela orientação no trabalho, pelo exemplo profissional;

À Valéria Lopes Caitar, que tanto me ajudou desde as etapas iniciais deste trabalho (companheira de bancada), também pela orientação, atenção, paciência e pela amizade;

Ao pesquisador da Embrapa Soja, Dr. Waldir Pereira Dias, pelas sugestões e ajuda no decorrer do trabalho;

Aos Analistas do Laboratório, Cesar Silveira, Marcia Kamogae Kuwahara, Silvana Rothenbach Marin, pela atenção e amizade.

Aos docentes do Programa de Biotecnologia: Dr. André Luiz, Dr. Cesar Tischer, Dra. Elisabete Ono, Dra. Geni Varéa, Dr. João Buzato, Dr. Luiz Filipe, Dra. Mara Lúcia, Dra. Mariângela Hungria, Dra. Maria Antonia, Dra. Maria Inês e Dra. Suzana Mali, pelas trocas de conhecimento e experiências que foram tão importantes na minha formação acadêmica;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, por sempre me ajudarem e tornarem agradável e divertida a rotina de laboratório: Adriana Polizel, Alan Pereira, Alessandra Yokoyama, Bianca Guimarães da Cruz, Bruna Sercero, Flavia Cal, Jean Carlos, João Vitor Maldonado, Juliane Marinho, Juliana Marcolino, Kátia Kuma, Luana Darben, Luciano Aoyagi, Michelle Rincão, Patricia Honna, Rafaela Reis, Renata Fuganti, Talita Parmezan, Thiago Nakayama, e Vera Lúcia Pierotte;

Aos amigos do Mestrado e Doutorado em Biotecnologia, Agnes Magri, Alana Carvalho, Aline Merci, Bettina Marks, Fabíola Carvalho, Francielle Vidotto, Glauber Mantovani, Hitoshi Saito, Jaque Bordini, Leonardo Guerreiro, Letícia Mileny, Marcos Roberto Oliveira, Melissa Hirozawa, Rebeca Fuzinato, Talita Martins, Tamires Minucelli, alunos da turma 2013, pelo companheirismo durante o período de disciplinas e por tornarem divertidas as aulas;

Meus pais, Celina Taiko e João Ferreira, pelo amor e dedicação;

Minha irmã, Ludmilla Leika, pela paciência de me levar para a Embrapa;
Aos meus tios e tias, pelos bons conselhos e apoio.

Todo o meu carinho e agradecimento!

***“Na juventude deve-se acumular o saber.
Na velhice fazer uso dele”.***

Rousseau

SILVA, Suellen Mika Hishinuma. **Efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* na resposta a infecção por *Meloidogyne javanica* em soja e *Arabidopsis thaliana***. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A soja é uma das principais leguminosas cultivadas no mundo, apresentando incrementos na produção e consumo ao longo dos anos. Embora haja destaque em sua produção, seu cultivo é comprometido pelo ataque de diferentes patógenos, como a infecção pelo nematoide *Meloidogyne javanica*. Em estudo recente, foi identificado o envolvimento do gene *GmHsp22.4*, que codifica uma pequena proteína de choque térmico (HSP20), na resposta da planta ao patógeno. Os níveis de expressão do gene foram altamente induzidos apenas no genótipo resistente após a infecção com o patógeno. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar o envolvimento deste gene na resposta de resistência ao nematoide. O efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* foi analisado em plantas de soja quiméricas e *Arabidopsis thaliana* sob infecção do nematoide. A comparação da região codificadora do gene entre os genótipos resistente (PI 595099) e suscetível (BRS 133; Williams 82) não revelou nenhum polimorfismo e sua superexpressão em raízes de soja, assim como em *A. thaliana* transgênica, não alterou a resposta de resistência, no entanto comprometeu o desenvolvimento das plantas. Baseado nos resultados, conclui-se que somente a superexpressão do gene *GmHsp22.4* não foi capaz de reverter o fenótipo de suscetibilidade em ambas as espécies, entretanto várias hipóteses foram levantadas a partir dos resultados que poderão auxiliar em trabalhos futuros visando o desenvolvimento de linhas de soja resistentes a este patógeno.

Palavras-chave: *Glycine Max.* *Arabidopsis thaliana*. Estresse biótico. HSP20. Expressão gênica. Nematoide.

SILVA, Suellen Mika Hishinuma. **Overexpression effect of gene *GmHsp22.4* in response to infection by *Meloidogyne javanica* in soybean and *Arabidopsis thaliana***. 2015. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Soybean is one of the most important crops worldwide, presenting great increases in consumption and production over the years. Although there are prominent in its production, cultivation is compromised by the attack of pathogens, such as infection by nematode *Meloidogyne javanica*. In a recent study, it was identified a small heat shock gene involved in the plant response to pathogen. The Hsp20 gene expression levels were strongly induced only in the resistant genotype following infection with the pathogen. Thus, this study aimed to elucidate the involvement of this gene in the resistance response to nematode. The effect of overexpression of *GmHsp22.4* gene was analyzed in chimeric soybean and *Arabidopsis thaliana*, under nematode infection. The sequences coding regions from resistant (PI 595099) and susceptible (BRS 133; Williams 82) genotypes were compared and revealed no polymorphism. Also, the overexpression analyses in soybean, as well as in transgenic *A. thaliana*, did not alter to the resistance response. Based on the results, it is concluded that only the overexpression of the gene *GmHsp22.4* was not able to reverse the phenotype of susceptibility to resistance in both species, but several hypotheses have been raised from the results that may help in future works aimed at developing soybean resistant lines to this pathogen.

Keywords: *Glycine max.* *Arabidopsis thaliana*. Biotic stress. HSP20. Gene expression. Nematode.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa do vetor gateway (pH7WG2D), utilizado para as transformações de raízes de plantas de soja e *A.thaliana*, via *A. rhizogenes* e análise da influência da região codificadora do gene em estudo na resposta ao estresse por nematoide. RB (*RightBorder*) e LB (*LeftBorder*), para a transformação das plantas. p35S, promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, promotor altamente ativo em plantas. *attR1* e *attR2*, sítios de recombinação. *ccdB*, gene de morte, codifica proteína inibidora da proteína girase. T35S, terminador do vírus do mosaico da couve-flor. *Egfp*, codifica proteína de fluorescência verde (GFP). *Hyg*, resistência ao antibiótico higromicina. *Sm/SpR*, resistência aos antibióticos estreptomicina e espectomicina.38
- Figura 2:** Sequência das etapas da transformação de raízes de soja com *A. rhizogenes*. A) Sementes com 5 dias de germinação. B) Excisão da radícula dos embriões a serem transformados. C e D) Inoculação das bactérias recombinantes nos embriões via injeção, de forma paralela ao feixe vascular. E) Plantas em meio de co-cultivo (meio contendo antioxidantes e vitamina).40
- Figura 3:** Cultivo das plantas de *A. thaliana*. A) Mudanças de *A. thaliana* cultivada em vasos contendo o substrato SunShine, cada tratamento realizado em triplicata. B) Corte das inflorescências para obtenção de maior número de gemas florais. C) Mudanças de *A. thaliana* após o corte das inflorescências.41
- Figura 4:** Seleção das plantas de *A. thaliana* transformadas. (A) Cultivo de *A. thaliana* em placa de seleção contendo higromicina. (B) Plantas de *A. thaliana* transformadas, localizadas à direita da figura e plantas de *A. thaliana* não transformadas, localizadas à esquerda da figura. ...42
- Figura 5:** Alinhamento da sequência da região codificadora do gene *GmHsp22.4* de soja nos genótipos PI 595099, Williams 82 e BRS 133 por meio do programa Bioedit46

- Figura 6:** Confirmação da clonagem de *E.coli* e da transformação das raízes de soja via *A. rizhogenes*. (I) Perfil de restrição do DNA plasmidial TOPO com as endonucleases *Nco I* e *EcoR V*. (II) Perfil de restrição do DNA dos clones do vetor pHGW2D com a enzima *BamH I* para confirmação da recombinação. (1) Ladder 1kb plus. (2) Ladder 100pb. (3) TOPO vazio. 4) TOPO + gene *GmHsp22.4*. (5) pH7WG2D. (6) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-1* repetição. (7) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-2* repetição. (8) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-3* repetição. (9) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-4* repetição. (10) negativo. (III) Expressão do marcador GFP nas raízes transformadas. (A) Visualização das raízes transformadas sob a fluorescência ao estereomicroscópio com filtro GFP. (B) Mesma raiz de A visualizada sob uma luz normal. (C) Visualização das raízes não transformadas sob o filtro GFP. (D) Mesma raiz de C visualizada sob luz normal.48
- Figura 7:** Resultado da reação de PCR das raízes de *A. thaliana* transformadas com o gene *GmHsp22,4*; vetor vazio G2D e não transformadas (selvagem). **A** Resultado da amplificação das 15 independentes raízes transgênicas transformadas com o Col-0:*GmHsp22,4* para o 1 evento (1-15); 2 evento (1-3) e 3 evento (1-6). **B** Amplificação das 15 independentes raízes transgênicas transformadas com o Col-0:vetor vazio G2D para os três eventos. **C** Amplificação das 15 independentes raízes transgênicas transformadas com a Selvagem Col-0.....50
- Figura 8:** Alteração morfológica das plantas de *A. thaliana* transformadas com o gene *GmHsp22.4*, Vetor vazio G2D e como controle a selvagem. **A)** Comparação do desenvolvimento da *A. thaliana* em Col-0: *GmHsp22.4*, Col-0: G2D Vetor Vazio e Selvagem Col-0, após 10 dias. *A. thaliana* transformada com o gene foi o que apresentou maior retardo no crescimento em relação ao vetor vazio e selvagem e, após 45 dias da germinação. *A. thaliana* transformada com o gene não apresentava o desenvolvimento das inflorescências comparadas com o vetor vazio G2D e selvagem. **B)** Diferença no crescimento da raiz de *A. thaliana* transgênicas e selvagem55

- Figura1S:** Mergulho dos botões florais na solução de infiltração73
- Figura 2S:** Plantas de *A. thaliana* após a inoculação. (A) coberta com plástico após o mergulho na solução de infiltração para manter a umidade. (B) Isolamento dos vasos vizinhos com as sílicas já castanhas por meio de um filme plástico73
- Figura 3S:** Imagem mostrando as galhas formadas por *M.javanica* nas raízes de soja controle e transformada com o gene *GmHsp22.4*. (A) Raízes do genótipo PI 595099 após 7 semanas da inoculação do nematoide. Pode se observar várias massas de ovos (esfera vermelha) e galhas (raízes mais grossas). (B) Raízes do genótipo Doko RC transformado com gene *GmHsp22.4* após 7 semanas da inoculação do nematoide. Observa-se a formação de galhas e massas de ovos em menor intensidade ao genótipo PI 59509974

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Sequências dos primers utilizados para o PCR em tempo real.....	45
Tabela 2:	Porcentagem de raízes/planta com a fluorescência verde brilhante (GFP) nos diferentes genótipos.	49
Tabela 3:	Valores da massa de ovos, número de galhas, fator de reprodução e nível de expressão do gene <i>GmHsp22.4</i> após a infecção do nematoide <i>M. javanica</i> a 8 e 54 dpi nas raízes de soja transformada e não transformada com o respectivo gene.	52
Tabela 4:	Comparação das características morfológicas das <i>A. thaliana</i> transgênica Col-0: <i>GmHsp22.4</i> , Col-0:Vetor vazio G2D e plantas não transformadas (selvagem).	56
Tabela 5:	Comparação da reprodução do nematoide <i>M. javanica</i> na raiz transgênica de <i>A. thaliana</i> Col-0: <i>GmHsp22.4</i> , Col-0:Vetor vazio G2D e não transformada (selvagem).	59

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	SOJA.....	20
2.2.	NEMATOIDES NA CULTURA DA SOJA	22
2.2.1.	Gênero <i>Meloidogyne</i> sp.....	24
2.3.	A FAMÍLIA HSP DE PLANTAS.....	25
2.3.1.	HSP20	25
2.4.	HSPS DE PLANTAS EM RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS	27
3.	OBJETIVO	31
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	ARTIGO 1: EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DO GENE <i>GmHsp22.4</i> FRENTE À INFECÇÃO POR <i>Meloidogyne javanica</i> EM SOJA E <i>Arabidopsis Thaliana</i>.....	32
4.1	INTRODUÇÃO	34
4.2	METODOLOGIA.....	35
4.2.1	Extração de DNA genômico de soja.....	35
4.2.2	Caracterização da região codificadora	36
4.2.3	Construção dos cassetes de expressão.....	37
4.2.4	Transformação de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> k599 e <i>Agrobacterium tumefaciens</i> gv3105.....	38
4.2.5	Transformação de raízes de soja suscetível (Doko RC) via <i>A. rhizogenes</i> 39	
4.2.6	Transformação de <i>A. thaliana</i> pelo método floral-deep (HARRISON, et.al., 2006).....	41
4.2.7	Bionsaio com nematoides.....	43
4.2.8	Quantificação da expressão do gene <i>GmHsp22.4</i> via RT-qPCR	44

4.3	RESULTADOS.....	46
4.3.1	Caracterização da região codante do gene <i>GmHsp22.4</i> em soja e identificação do gene ortólogo em <i>A. thaliana</i>	46
4.3.2	Confirmação da transformação de <i>E.coli</i>	46
4.3.3	Eficiência de transformação de raízes de soja com <i>A. rhizogenes</i> e de <i>A. thaliana</i> com <i>A. tumefaciens</i>	48
4.3.4	Caracterização morfológica dos eventos de <i>A. thaliana</i>	53
4.3.5	Bioensaios com nematoides.....	57
4.4	DISCUSSÃO	60
4.5	CONCLUSÕES	65
4.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	DADOS SUPLEMENTARES	73

1. INTRODUÇÃO

Através do controle sobre a expressão gênica, os seres vivos são capazes de regular mecanismos de resposta aos mais variados estímulos/estresses provindos do ambiente. Os estresses bióticos e abióticos podem desencadear diversos mecanismos de defesa nas plantas, tais como a ativação de genes normalmente inativos e a repressão de genes normalmente ativos, quando em condições ideais. Devido à sua ativação em determinadas situações de estresse, algumas famílias gênicas já foram foco de análises para a classificação e caracterização, e este é o caso de um grupo de proteínas denominado de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins) (AL-WHAIBI, 2011).

Essas proteínas foram inicialmente observadas nas glândulas salivares de moscas *Drosophila* ssp. sob estresse de choque térmico (FREITAS et al., 2012). Com base no seu tamanho e homologia de sequência, as HSPs foram agrupadas em, até o momento, cinco classes, sendo essas HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e HSP20 ou small Heat Shock Proteins (sHSPs). As proteínas de choque térmico tem como função a atuação como chaperonas moleculares, realizando a manutenção da estrutura espacial de outras proteínas que sofrem com a alteração da temperatura (FREITAS et al., 2012).

As pequenas proteínas de choque térmico são encontradas em organismos procariotos e eucariotos, mas apresentam-se em maior número nos organismos do reino vegetal, muito provavelmente relacionado à biologia sésil das plantas. Estas proteínas não são apenas induzidas após o choque térmico, mas também por outros estímulos abióticos, como o déficit de água, metais pesados, ozônio e radiação UV (BARCALA et al., 2008), bem como sob estresses bióticos, por exemplo a infecção pelos nematoides do gênero *Meloidogyne* (FUGANTI et al. 2010; BARCALA et al. 2008; VAN OOIJEN et al., 2010).

O gênero *Meloidogyne* compreende um grande número de espécies, das quais *M. incognita* e *M. javanica* são as mais comuns, sendo responsáveis por expressivas perdas na cultura da soja, em especial em regiões central do Brasil, onde concentra-se grande parte da produção Brasileira (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; FRANZENER et al., 2005).

Em um estudo precedente, realizado por Lopes-Caitar al., (2013) seis genes *Hsp20* mostraram-se significativamente induzidos no genótipo de soja resistente

(PI595099) ao patógeno *M. javanica*, após oito dias de interação, enquanto no genótipo suscetível (BRS133), estes genes apresentaram-se significativamente reprimidos após o mesmo período. Dentre estes, o gene *GmHsp22.4* apresentou um nível de expressão gênica relativa mais acentuada, em torno de 60 vezes maior, quando comparado aos outros dois genes *Hsp20* responsivos à mesma condição.

Dado todo o exposto, a importância da cultura da soja para o Brasil e o mundo e, principalmente, a dimensão dos danos causados pelos nematoides fitoparasitas (ALVES et al., 2011), este trabalho buscou elucidar o envolvimento do gene *GmHsp22.4* na resposta à infecção por *M. javanica* em soja, via estudos funcionais *in vivo*, visando o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para resistência a este fitopatógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SOJA

A soja é uma planta pertencente ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabacea (Leguminosae)*, subfamília *Faboideae (Papilionoideae)*, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e sua forma cultivada é chamada de *Glycine max* (L.) Merrill. (DONG et al., 2004; SEDIYAMA, 2009).

Botanicamente, a soja é uma planta anual, herbácea, ereta, autógama, com altura variando entre 30 a 200 cm, com presença densa ou escassa de ramificação, nas quais suas características morfológicas são dependentes de cultivares e condições de crescimento e ambiente (ANDRADE, 2012; LIU, 1997). O seu ciclo (número de dias da emergência até a maturação) varia de 70 (para as cultivares mais precoces) a 200 dias (para as mais tardias) (ANDRADE, 2012; SEDIYAMA, 2009).

De acordo com a literatura chinesa, a soja já era conhecida, cultivada e utilizada como alimento pelo homem há mais de 5000 anos a. C. Sendo assim, a palavra originou-se do japonês *shoyu* (shu em chinês) e a sua primeira descrição foi apresentada no livro “Pen Ts’ ao Kong Mu”, no qual o Imperador chinês Sheng Hung, aproximadamente no ano 2383 a 2838 a.C., descreveu as plantas da China (BONATO; BONATO, 1987; NOGUEIRA, 2007; SEDIYAMA, 2009).

A soja é uma das mais importantes leguminosas cultivadas, sendo considerada como um dos cinco grãos sagrados, juntamente com o trigo, arroz, cevada e milho, essenciais para a civilização chinesa. Em “O livro dos Cânticos”, um dos cinco clássicos chineses, shu apareceu em 7 de 305 canções escritas entre os séculos 11 e 7 a.C. (LIU, 1997; SEDIYAMA, 2009). Assim, o gênero *Glycine* tem várias espécies originárias de regiões como África, Ásia oriental e Austrália (SEDIYAMA, 2009). De acordo com os relatos existentes e evidências geográficas, a domesticação da soja teve início há cerca de 1100 anos a.C, na região nordeste da China (LIU, 1997). Já na Coreia, e posteriormente no Japão, a sojicultura foi introduzida por volta de 200 a 300 anos antes da Era Cristã (BONATO; BONATO, 1987; SEDIYAMA, 2009).

Deste modo, a soja manteve uma cultura exclusiva para o Oriente durante muitos séculos e a primeira introdução na Europa (França-Paris) foi por volta de

1712 a 1740, por um botânico alemão, Engelbert Kaempfe (LIU, 1997), quando este recebeu sementes enviadas da China por missionários. Em 1875, teve início uma grande campanha visando o cultivo da soja na Europa e, apenas em 1804, a soja foi citada, pela primeira vez, nos Estados Unidos da América do Norte. Todavia, até 1941, o principal uso da soja naquele país era na alimentação animal (LIU, 1997; SEDIYAMA, 2009).

No Brasil, a primeira referência sobre a soja foi em 1882, no Estado da Bahia, por Gustavo D'utra (BONATO; BONATO, 1987). Mais tarde, em 1891, novas cultivares foram introduzidas em Campinas, São Paulo, onde a soja apresentou melhor desenvolvimento e relação ao da Bahia. Neste mesmo ano, foi introduzida no Rio Grande do Sul e, em 1908, com a vinda dos imigrantes japoneses para São Paulo, foram introduzidas novas cultivares, mais específicas para o consumo humano (SEDIYAMA, 2009).

Como já citado, durante séculos a soja tem sido fundamental na nutrição e gastronomia do leste asiático, isto porque seu grão é rico em proteínas, com cerca de 40%, 20% de óleo e também por ser uma potente fonte de alimento funcional (HYMOWITZ; NEWELL, 1981; LI et al., 2013; SEDIYAMA, 2009).

Dentre os alimentos derivados da soja, destacam-se, principalmente, o missô, shoyu (molho de soja), tempeh e tofu, que se diferem perante o sabor e aspecto físico dos grãos originais (HYMOWITZ; NEWELL, 1981).

Além disso, a planta de soja pode ser utilizada como adubo verde, forragem, silagem, feno, biodiesel, desinfetantes, lubrificantes, sabão, e etc. O farelo é utilizado na alimentação humana e animal e, também, na manufatura de muitos produtos processados ou semi-processados (MAPA, 2013; SEDIYAMA, 2009).

Como componente essencial na fabricação de rações animais e com uso crescente na alimentação humana, a soja é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas, correspondendo a 49% da área cultivada em grãos do país (MAPA, 2013). De acordo com o Ministério da Agricultura, estima-se uma produção de 95,92 milhões de toneladas para safra de 2014/2015, 11,4% superior as 86,12 milhões de toneladas colhidas em 2013/14 (CONAB, 2015). Ainda de acordo com a (CONAB, 2015), a produtividade nacional atingirá a média de 3.000 kg.ha⁻¹. Esse crescimento representará um incremento de 11,6% em relação à produtividade obtida em 2013 (CONAB, 2015).

Logo, a indústria nacional transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja em 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite (MAPA, 2013).

2.2. NEMATOIDES NA CULTURA DA SOJA

Há, em todo o mundo, várias espécies de nematoides capazes de parasitar a soja. Contudo, as espécies de maior interesse e importância econômica são os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.); os de cisto da soja (*Heterodera glycines*); os das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) e o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; FERRAZ, 2001; FRANZENER et al., 2005). Estes nematoides podem ser assim, endoparasitas ou semi-endoparasitas e sedentários, como é o caso do de galha, ou migradores, como os do gênero *Pratylenchus* sp. (FERRAZ, 2001).

Em 1992, o nematoide de cisto da soja (NCS) foi encontrado em municípios dos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e, apesar de decorrer apenas 10 anos da detecção da espécie, a área infestada evoluiu de 10.000 para cerca de 3 milhões de hectares, distribuídos em sete estados e 84 municípios (ASMUS; ANDRADE, 2002; FRANZENER et al., 2005). Igualmente na safra de 1991/92, este patógeno causou prejuízo superior a 100 milhões de dólares, entre perdas diretas e indiretas, tratando-se de uma espécie altamente danosa à soja, podendo constituir fator limitante ao seu cultivo (FERRAZ, 2001).

No Brasil central, em condições de populações muito elevadas, especialmente se associadas ao excesso de calagem, as perdas por causa do NCS chegam a atingir 100% (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

No Paraná, o primeiro relato ocorreu em 1996, no município de Sertaneja, norte do Estado. No oeste do Paraná, os únicos relatos da ocorrência desta espécie foram em Marechal Cândido Rondon e Tupãssi (FRANZENER et al., 2005). Sendo assim, este nematoide está presente em aproximadamente 35% das áreas produtoras do Mato Grosso, com maior ocorrência nas regiões Sudeste, Médio Norte e na Chapada dos Parecis (RIBEIRO; DIAS; SANTOS, 2010).

No caso do nematoide de lesões (*Pratylenchus brachyurus*) a disseminação ocorre em áreas produtoras de soja no Estado do Mato Grosso e recentemente, tem

causado danos elevados na cultura (RIBEIRO; DIAS; SANTOS, 2010). De acordo com Aprosoja, (2014), observou-se uma perda direta na produtividade de soja em até 30%.

Em um levantamento realizado na safra em 2008/09, 96% das 411 amostras coletadas nas principais regiões do Mato Grosso, detectou-se a presença de *P. brachyurus*. Ainda nesse levantamento, foi observada uma alta frequência de amostras com população de *Pratylenchus* excessivamente elevada, acima de 1000 indivíduos por grama de raízes de soja (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Outro parasita relativamente comum da soja, e que vem se destacando como um dos mais importantes patógenos do sistema radicular no centro-sul de Mato Grosso do Sul e do sul do Mato Grosso, é o nematoide reniforme, *Rotylenchulus reniformis*. No caso do primeiro estado citado, estima-se que o nematoide reniforme ocorra em 19 importantes municípios produtores de soja, o que corresponde a uma área de aproximadamente 600 mil hectares (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Os danos causados pelas espécies do gênero *Rotylenchulus*, através de avaliações preliminares, evidenciaram perda de até 32% do rendimento de soja nas áreas infestadas, e, ainda em alguns estudos, mostraram-se bem variáveis em função dos fatores bióticos e abióticos (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; FERRAZ, 2001).

Por fim, o gênero *Meloidogyne* compreende um grande número de espécies, das quais *M. incognita* e *M. javanica* são as mais comuns, inclusive no oeste do estado, limitando a produção de soja no Brasil. (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; FRANZENER et al., 2005).

Franzener et al. (2005) apontaram que, dos 21 municípios amostrados do estado do Paraná, 19 apresentaram pelo menos uma das espécies, *M. incognita* e/ou *M. javanica*. Nos municípios de Cascavel, Toledo, Corbélia, Entre Rios do Oeste e Missal, o levantamento indicou que a espécie *M. javanica* prevaleceu. Ao contrário, em Pato Bragado, Palotina, Altônia e Nova Santa Rosa, a espécie mais frequente foi *M. incognita*. Além disso, neste levantamento, foram encontrados nematoides de galha e de cisto em nove municípios paranaenses.

Diferentemente do NCS, os primeiros registros de danos em soja pelos nematoides de galhas no Brasil coincidem com a introdução da cultura no país e, no ano de 1989 no município de Pedrinhas Paulista-SP, houve uma perda de 18% na produção de grão de soja nas manchas mais atacadas por *M. javanica*. Na safra

anterior, em propriedades da região, as perdas haviam sido de aproximadamente 56% (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

2.2.1. Gênero *Meloidogyne* sp.

Como já citado, os nematoides causadores de galha são os principais patógenos responsáveis pela redução da produção nos centros produtores de soja, principalmente em regiões de clima quente e solos arenosos. A forma de disseminação desse patógeno pode ocorrer através da água de irrigação, vento, a movimentação de máquinas agrícolas entre propriedades e também quando utilizam sementes de baixa qualidade, por meio de partícula de solo misturada as sementes (SEDIYAMA, 2009).

Em lavouras de soja infestadas pelo nematoide de galha, os principais danos observados nas plantas são o porte reduzido e o amarelamento, normalmente formando manchas circulares (reboleiras) dispostas na lavoura. Além disso, nas raízes, são formados conjuntos de células gigantes no cilindro vascular, periciclo e endoderme, resultado da ação de substâncias químicas injetadas pelos nematoides, levando a deformação e engrossamento das raízes. Em casos de ataques severos, as galhas unem-se, inibindo a formação de raízes secundárias e levando à morte das plantas (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; BONATO, 2000; FERRAZ, 2001; SEDIYAMA, 2009).

Em relação ao ciclo de vida dos nematoides do gênero *Meloidogyne*, o fator crucial é a temperatura, a qual oscila entre 15 °C a 30 °C, completando o seu ciclo de vida em 25 dias sob temperatura de 27 °C, mas pode se tornar mais longo em temperaturas mais elevadas ou inferiores (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

O ciclo inicia-se com as fêmeas adultas de *Meloidogyne*, localizadas no interior de raízes de planta de soja parasitadas, produzindo em média cerca de 500 ovos cada. Esses ovos ficam depositados numa substância gelatinosa (massa de ovos) e seguem para diferentes estádios de desenvolvimento até atingir o primeiro estágio juvenil (J₁). Neste estágio, ocorre a ecdise dentro do ovo, tornando-se juvenil de segundo estágio (J₂) (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Após a eclosão, o J₂ move-se no solo até encontrar as raízes da planta para penetrá-la, e, em seguida, dentro da raiz da soja, o J₂ migra para a região dos vasos e, se a planta é suscetível, torna-se sedentário e começa a alimentar-se das células

em volta da sua região labial. Nesse momento, o nematoide insere o estilete e secreta substâncias que estimulam o aparecimento das células de alimentação, denominadas células gigantes. Por fim, o nematoide continua seu desenvolvimento, sofrendo mais três ecdises até atingir a fase adulta de macho ou fêmea. O macho, que é vermiforme, não se alimenta e, normalmente, não é necessário para reprodução de *M. incognita* ou *M. javanica*. Entretanto, o macho tem grande importância no mecanismo de sobrevivência e na variabilidade genética, através de eventos de recombinação (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

2.3. A FAMÍLIA HSP DE PLANTAS

As exposições aos estresses biótico e abiótico são sérias ameaças para a viabilidade celular, portanto, todos os organismos desenvolvem respostas, que se caracterizam por meio da síntese de proteínas altamente conservadas. Nos eucariotos, estas respostas incluem a síntese de classes de proteínas conjuntamente denominadas de proteínas de choque térmico. Tais proteínas são divididas em duas classes maiores de acordo com seu peso molecular. Dentre as HSP de alto peso molecular, destacam-se as proteínas HSP 110, 90, 70, e 60, que apresentam peso em torno de 57 a 114 kDa, sendo encontradas no citosol, mitocôndrias e cloroplastos. As pequenas proteínas de choque térmico (HSP20) apresentam peso de 15 a 30 KDa, estando presentes também no retículo endoplasmático (FREITAS et al., 2012).

2.3.1. HSP20

As plantas apresentam, no mínimo, 20 pequenas proteínas de choque térmico, e dependendo da espécie esse valor pode atingir até 40 diferentes proteínas HSP20. Em contraste, vários outros organismos tem apenas uma ou algumas HSP20, como no caso da *Saccharomyces cerevisiae* tendo uma HSP20 ou a *Drosophila* apresentando apenas quatro. Além disso, nas plantas observa-se uma diversificação da localização subcelular dessas proteínas, estando presentes desde o citoplasma, cloroplasto, retículo endoplasmático e mitocôndria. Diferentemente das plantas, as HSP20 de outros organismos se localizam apenas no citosol (BONDINO; VALLE; TEN HAVE, 2012; WATERS, 1995).

Em sua estrutura, as HSP20 apresentam uma região hidrófoba N-terminal, bastante divergente em sequência e comprimento entre as diferentes proteínas, seguida por um domínio conservado de aproximadamente 90-100 resíduos de aminoácidos na parte C-terminal da proteína e uma extensão curta C-terminal (HASLBECK, 2002; KOTAK et al., 2007; VAN OOIJEN et al., 2010; XU; ZHAN; HUANG, 2011).

A região conservada, também denominada de domínio α -cristalino, mostra uma similaridade de sequência com a proteína da lente do olho de um animal vertebrado (que evita a precipitação de proteína e a formação de cataratas no cristalino dos olhos) (CASPER; LEUNISSEN; DE JONG, 1995; LIBEREK; LEWANDOWSKA; ZIETKIEWICZ, 2008).

Contudo, uma das características mais marcantes das HSP20 é a sua organização em grandes estruturas oligoméricas em torno de 8-50 subunidades e com tamanho variando de 200 a 800 kDa no seu estado nativo (HASLBECK, 2002; KOTAK et al., 2007; LEE et al., 1997). Os estudos realizados indicam que o dímero é a menor unidade de troca, sendo este conservado e podendo constituir a unidade funcional que caracteriza as chaperonas. Além disso, a dobra deste bloco de construção dimérica se assemelha à dobra da proteína HSP20 do ser humano, p23, uma co-chaperona de HSP90, logo há indicativos que sugerem cooperação das HSP20s com as HSP90s (HASLBECK, 2002).

Aparentemente, o número de genes codificadores de *Hsp20* nos organismos é relacionado à escala evolutiva, no qual os organismos unicelulares, como as bactérias, têm apenas um ou dois genes *Hsp20*, enquanto os organismos multicelulares, como as plantas, podem ter até 30 *Hsp20* no genoma, dependendo da espécie. Dez famílias distintas de *Hsp20* foram reconhecidas e, dentre estas, quatro famílias se localizam no citoplasma e as outras seis famílias são de proteínas com atividade nas organelas celulares, incluindo o núcleo, o cloroplasto, a mitocôndria, o retículo endoplasmático, e os peroxissomos (CASPER; LEUNISSEN; DE JONG, 1995; JONG; LEUNISSEN; VOORTER, 1993; VIERLING, 1991; XU; ZHAN; HUANG, 2011). Sob condições de estresse, as *Hsp20* podem compreender mais do que 1% do conteúdo proteico da célula, atribuindo a estas proteínas a proteção de, praticamente, todos os compartimentos celulares (HASLBECK, 2002; KOTAK et al., 2007).

Os genes *Hsp20* não são expressos em níveis detectáveis em folhas de plantas cultivadas, quando em condições ideais, mas, em muitas espécies, eles estão entre as proteínas mais abundantes induzidas pelos estresses por diversos fatores e agentes (HASLBECK, 2002; VIERLING, 1991).

Estudos sobre a função das *HSP20s* citosólicas sugeriram a hipótese de que as HSP20 mantêm as demais proteínas celulares em um estado ativo em condições estressantes, por meio da ligação dos dímeros dissociados das HSP20 com as proteínas desnaturadas (HASLBECK, 2002; LEE et al., 1997; LIBEREK; LEWANDOWSKA; ZIETKIEWICZ, 2008; XU; ZHAN; HUANG, 2011). Segundo esta hipótese, a dissociação induzida por calor das HSP20 poderia levar à exposição da região hidrofóbica e conseqüentemente, à estabilização das proteínas desnaturadas (VAN OOIJEN et al., 2010; XU; ZHAN; HUANG, 2011).

Em seguida, a HSP20 coopera com outras chaperonas moleculares dependentes de ATP, tais como a HSP70, HSP90, HSP100 e GroEL, para redobrar as proteínas (KOTAK et al., 2007; XU; ZHAN; HUANG, 2011). Além disso, as HSP20s apresentam uma estequiometria de ligação muito maior do que outras chaperonas moleculares, levando assim à algumas especulações de que as HSP20 tem funções de um reservatório para estabilizar o fluxo de proteínas desnaturadas em resposta ao estresse (VAN OOIJEN et al., 2010; XU; ZHAN; HUANG, 2011).

2.4. HSPS DE PLANTAS EM RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS

Vários trabalhos relatam que as HSP60, HSP70 e HSP90 funcionam como chaperonas moleculares ativadas em resposta ao estresse de calor, no entanto, trabalhos recentes também descrevem o envolvimento destas proteínas na resposta a estresses causados por agentes biológicos, durante o desenvolvimento da planta, e resposta de resistência às doenças (LU et al., 2003; XU et al., 2012).

Adi et al. (2012) descreveram o envolvimento de HSP de alto peso molecular em infecções virais, causadas por *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) em tomate, demonstrando que tais chaperonas podem estar relacionadas com a patogênese viral, ou na participação dos mecanismos de resposta celular, para aliviar a tensão causada por uma infecção. Os autores descreveram que agregados das HSP70s eram mais abundantes em plantas suscetíveis ao vírus em comparação com as plantas resistentes, além disso, as HSP70s solúveis, ou seja, não ligadas a proteína

da capa viral, foram predominantes nas plantas resistentes. Logo, os autores sugeriram que, em plantas resistentes, a HSP70 desempenhava, principalmente, um papel de limpeza e manutenção da homeostase em baixo estresse biótico (ADI et al., 2012).

Ainda, Adi et al. (2012) analisou a expressão do gene de tomate *BiP2* (HSP70 localizada no retículo endoplasmático) em genótipos suscetível e resistente, verificando um aumento na expressão quando infectado por TYLCV no período 7-21 dpi, e redução significativa apenas no genótipo suscetível após os 21 dpi, acreditando que seja por meio da regulação transcricional de HSP70. Comprovou assim, que as chaperonas como BiP desempenham um papel importante na síntese de proteínas e na proteção de estruturas celulares durante os processos relacionados com o estresse. Portanto, o aumento da estabilidade de proteínas, decorrente da ação das chaperonas, em plantas resistentes, pode resultar no desenvolvimento de um estado de equilíbrio, permitindo que as células se protejam de danos induzidos por vírus (ADI et al., 2012).

O envolvimento direto de HSP90 na resposta de resistência das plantas aos patógenos foi descrito pela sua interação com a proteína SGT1 durante a resposta mediada por genes de resistência (R). Tais genes codificam proteínas que reconhecem, direta ou indiretamente, as moléculas efetoras do patógeno (codificadas por genes Avr) (SHIRASU; SCHULZE-LEFERT, 2003), e são ativados durante a percepção do patógeno, levando a uma resposta específica de resistência. A interação de SGT1 e HSP90 nas plantas estaria relacionada com o papel de chaperona na transdução de sinal, montagem ou no regulamento conformacional de diversos complexos multiproteicos (BENTEM et al., 2005; BHATTARAI et al., 2007; SHIRASU; SCHULZE-LEFERT, 2003). Evidências apresentadas sugerem que as proteínas HSP90, RAR1 e SGT1 agem para estabilizar o acúmulo e manutenção de produtos de genes de resistência em conformação correta para a sinalização da resistência, apesar de ainda haver muito a ser estudado sobre os seus mecanismos (SCOFIELD et al., 2005).

Segundo Scofield et al. (2005), em cultivo de trigo as expressões de RAR1, SGT1 e HSP90 são requeridas na resistência mediada por LR21 (gene de resistência à ferrugem de folhas).

De modo similar, na resposta de resistência mediada pelo gene I-2 de tomate, ao agente patogênico fúngico *Fusarium oxysporum*, as interações das proteínas R

com HSP90, e seus co-fatores com o PP5, RAR1 e SGT1, são reguladas pela montagem e desmontagem do heterocomplexo HSP90 para alcançar o controle ideal de maturação, tanto para proteína de resistência quanto para a sinalização dinâmica (BENTEM et al., 2005).

Estudos recentes demonstrados por Bhattarai et al. (2007) e Xu et al. (2012), revelaram que as HSP90s também estão envolvidas nas vias de transdução de sinal de plantas resistentes a insetos, por exemplo, a interação de HSP90 e a proteína de resistência Mi-1 de tomate, que confere resistência a nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), pulgões batata (*Macrosiphum euphorbiae*) e mosca-branca de batata doce (*Bemisia tabaci*). O silenciamento do gene HSP90 resultou na atenuação de resistência para ambos os patógenos, onde os pulgões sobreviveram em folhas novas das plantas geneticamente resistentes, da mesma forma, os nematoides de galhas foram capazes de penetrar, desenvolver e depositar massas de ovos nas raízes. Esses resultados demonstram que a HSP90 é necessária para a resistência mediada por Mi-1 (BHATTARAI et al., 2007).

Aparentemente, a HSP90 citosólica também está relacionada a alguns genes de resistência a diferentes doenças, como para o gene Pto (resistência a *Pseudomonas cloves* em tomate), N (resistência ao vírus do mosaico do tabaco-TMV em tabaco) e Rx (resistência ao vírus da batata X-PVX em batata), RPM1 (resistência a *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis*). Os três primeiros exemplos de resistência a doenças envolvem proteína NBS-LRR: N e Rx, ambos codificam proteínas desta classe, e resistência Pto, que é dependente do produto de RN-LRR Prf (HEIN; BARCISZEWSKA-PACAK, 2005; LU et al., 2003; SCOFIELD et al., 2005; WANG et al., 2011).

Vários trabalhos relatam também o envolvimento das HSP20 na resposta de resistência a patógenos, tais como fungos, bactérias e nematoides (ESCOBAR et al., 2003; ZHANG et al., 2014b).

Especificamente na resposta à infecção por nematoides, Escobar et al., (2003), caracterizaram o envolvimento do gene *HsHsp17.4* de soja na resposta à infecção pelo nematoide *M. incognita*. A ligação da região promotora de *HsHsp17.4* ao gene marcador GUS induzia a expressão de GUS e, conseqüentemente, a coloração de 10% de galhas nas raízes após 1 a 3 dias de infecção com *M. incognita*, atingindo 50 a 70% da coloração aos 17 a 20 dias após a infecção. Mutações em regiões específicas do promotor *HaHsp17.7G4*, onde se ligam os

fatores de transcrição de choque térmico, levaram a uma acentuada elevação da infecção pelo nematoide.

Fuganti (2004) identificou dois marcadores moleculares microssatélites, Satt 144 e o marcador SoyHSP 176, ligados à resistência da soja ao nematoide *M. javanica*. O marcador SoyHSP 176 estava posicionado na região que continha o gene *GmHsp17.6-L*. Posteriormente, os níveis de expressão de *GmHSP17.6-L* se mostraram diferencialmente regulados entre indivíduos resistentes e suscetíveis da população de mapeamento, sendo induzidos apenas nos indivíduos resistentes (FUGANTI et al., 2010).

Kandoth; Ithal; Recknor (2011) também abordaram o envolvimento de HSP20 em soja na resistência ao nematoide *Heterodera glycines*. Neste estudo, foi realizada a comparação do perfil de expressão gênica do *locus* Rhg 1, de plantas de soja em estágio de desenvolvimento do sincício, por meio do acoplamento microdissecção e captura a laser e posterior análise de microarranjo. Os resultados deste estudo indicaram a presença de pelo menos 4 genes codificadores para HSP20 com perfil up-regulados em sincícios da linha resistente.

Recentemente, Lopes--Caitar et al. (2013) abordaram sobre a identificação *in silico* dos membros da família de genes *Hsp20* em soja, e a caracterização do perfil de expressão dos *GmHsp20*, *in vivo*, sob estresse biótico e abiótico. Como resultado, houve a identificação de uma *GmHsp20* sensível ao choque térmico e à infecção por nematoide, a *GmHsp22.4*, com expressão divergente entre os genótipos de soja resistentes e suscetíveis. Além disso, alguns dos elementos regulatórios putativos, que mostraram um padrão de ocorrência única nos genes que respondiam a infecções por nematoides, apresentaram-se conservados nos promotores desta *GmHsp20*.

3. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* na resposta de resistência ao nematoide *M. javanica* em soja e *Arabidopsis thaliana*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se há polimorfismos na região codificadora do gene *GmHsp22.4* entre as cultivares de soja resistente e suscetível a *M. javanica*;
- Avaliar funcionalmente o gene *GmHsp22.4* na resistência a *M. javanica* via superexpressão em plantas compostas de soja e na planta modelo *A. thaliana*.

4 ARTIGO 1: EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DO GENE *GMHSP22.4* FRENTE À INFECÇÃO POR *Meloidogyne javanica* EM SOJA E *Arabidopsis Thaliana*.

SILVA, Suellen Mika Hishinuma. **Efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* frente à infecção por *Meloidogyne javanica* em Soja e *Arabidopsis thaliana*.** 2015. 74fs. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

RESUMO

A soja constitui uma das principais matérias prima utilizada na produção de óleo, combustível e na alimentação humana e animal. Sua produção vem se elevando a cada ano nos países, tanto devido à expansão da área cultivada como devido a ganhos em produtividade. O Brasil é considerado o segundo maior produto de soja no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos. Apesar disso, a cultura da soja sofre com vários danos causados por diversos estresses, um deles sendo a infecção pelos nematoides. O emprego de cultivares resistentes associado a práticas de manejo da cultura e do solo tem sido as principais formas de controle desse patógeno. Em soja, a resposta de resistência a estes patógenos tem sido caracterizada tanto pelo envolvimento de genes de efeito maiores ou qualitativos, como poligenes, sendo que vários estudos visam caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta de resistência. HSP20 constituem uma classe de proteínas abundantes em plantas capazes de responderem a estresses bióticos e abióticos. Atuam como chaperonas moleculares estando diretamente envolvidas na manutenção estrutural de proteínas. Pelo menos seis HSP20 foram identificadas como responsivas a infecção por *Meloidogyne javanica* em soja, sendo que o gene *GmHsp22.4* foi o mais expresso, atingindo níveis cerca de 60 vezes superiores quando comparado ao controle. Ao se comparar a região codificadora do gene *GmHsp22.4* entre genótipos de soja suscetível e resistente ao patógeno nenhum polimorfismo foi detectado, indicando que o provável envolvimento do genes na resposta a este patógeno seria devido a elevação dos níveis de expressão. No entanto, a superexpressão transiente do gene em raízes de plantas compostas de soja não levou a reversão do fenótipo de suscetibilidade após a infecção com o patógeno. Plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *GmHsp22.4* de modo constitutivo apresentaram alterações no desenvolvimento, com reduções significativas no tamanho de raízes e folhas, no entanto não foi possível observar uma resposta de resistência à infecção com o parasita. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a elevação dos níveis de expressão de uma única chaperona não foi capaz de levar à resistência a infecção por *M. javanica* em soja e *A. thaliana*.

Palavras-chave: Soja; Estresse biótico; Gene *Hsp20*; Expressão gênica; Nematóide.

SILVA, Suellen Mika Hishinuma. **Overexpression Effect of Gene *GmHsp22.4* in response to infection by *Meloidogyne javanica* in soybean and *Arabidopsis thaliana***. 2015. 74ps. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina –PR.

ABSTRACT

Soy is one of the main raw materials used in the production of oil, fuel and human and animal consumption. Its production has been increasing each year in the country, both due to the expansion of the cultivated area as due to productivity gains. Brazil is considered the 2nd largest soybean producer in the world, standing behind only the United States. Nevertheless, soybean suffers various damages caused by several stresses, one of them being infected by nematodes. The use of resistant cultivars associated with management practices of crop and soil has been the main way to control this pathogen. In soybean, the resistance response to these pathogens has been characterized by the involvement of both genes higher or qualitative effect as polygenes, and various studies aimed at characterizing the molecular mechanisms involved in the resistance response. HSP20 are a class of abundant proteins in plants capable of responding to stress biotic and abiotic. Act as molecular chaperones being directly involved in the structural maintenance of proteins. At least six HSP20 were identified as responsive to infection by *M. javanica* in soybean, wherein the gene *GmHsp22.4* was more expressed, reaching levels nearly 60 fold higher when compared to control. Comparing the coding region of the gene *GmHsp22.4* between susceptible and resistant genotypes to the pathogen no polymorphism was detected, indicating that the likely involvement of genes in response to this pathogen would be due to increased levels of expression. However, transient overexpression of the gene in plants consisting of soybean roots did not lead to reversal of susceptibility phenotype after infection with the pathogen. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing the constitutive mode *GmHsp22.4* gene showed changes in development, with significant reductions in the size of roots and leaves, however it was not possible to observe an infection resistance response to the parasite. Based on these results, it is concluded that elevated levels of expression of a single chaperone was not able to lead to resistance to infection by *M. javanica* in soybean and *A. thaliana*.

Keywords: Soybeans; Biotic stress; Gene *GmHsp20*; Gene expression; *Nematode*.

4.1 INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa anual que fornece mais da metade das gorduras vegetais, óleos e farinhas de proteína do mundo, sendo assim, sua produção mundial tem aumentado rapidamente, sendo estimada uma produção de 95,92 milhões de toneladas para safra de 2014/2015, 11,4% superior à colhida em 2013/14 (CONAB, 2015; VUONG; JIAO, 2013).

Apesar do aumento de sua produção, existem muitas doenças e pragas que podem infectar e causar danos à cultura, resultando em perdas significativas de produtividade. Dentre estes patógenos, destacam-se os fitonematoides, que são encontrados em todas as principais áreas de cultivos de soja no Brasil e no mundo. As perdas agrícolas mundiais podem chegar a 12,3%, o que representam perdas que ultrapassam 125 bilhões de dólares ao ano (LOPES, 2009).

Várias medidas têm sido empregadas para o controle dos fitonematoides, como a rotação de culturas, a utilização de cultivares resistentes, uso de nematicidas, e o emprego de controle biológico e de transgenia, visando à inserção de genes de resistência e ou defesa (LOPES, 2009). Dentre essas medidas, a resistência genética é a principal forma de controle de muitas doenças, entretanto, para um grande número de doenças não existem cultivares resistentes, ou seu número é limitado a algumas raças do patógeno ou não apresentam uma resistência durável (EMBRAPA SOJA, 2013). Desse modo, a compreensão dos mecanismos moleculares de resistência tem sido explorada visando o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas para o controle desses patógenos.

As pequenas proteínas de choque térmico (Hsp20) constituem uma classe de proteínas responsivas a estresses bióticos e abióticos. Vários trabalhos relatam o envolvimento destas proteínas na resposta de resistência a patógenos, tais como fungos, bactérias e nematoides (ESCOBAR et al., 2003; 2012; ZHANG et al., 2014). Tais genes codificam proteínas com função de chaperonas moleculares que atuam principalmente auxiliando o dobramento correto ou na degradação de proteínas desnaturadas e agregadas. A análise *in silico* dos membros da família de genes *Hsp20* em soja, seguida de sua caracterização transcricional frente aos estresses de temperatura e à infecção com *M. javanica* levou a identificação de uma *GmHsp20* sensível ao choque térmico e à infecção por nematoides. A *GmHsp22.4* apresentou

expressão divergente entre os genótipos de soja resistentes e suscetíveis, sendo altamente induzida após a infecção.

Nesse trabalho, o provável efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* na resistência a *Meloidogyne javainca* foi avaliado em plantas quiméricas de soja e em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. Embora a metodologia empregada tenha sido eficiente na promoção da superexpressão do gene *GmHsp22.4*, não foi possível observar correlação entre a expressão do transgene com o fenótipo de resistência.

4.2 METODOLOGIA

Para analisar o efeito do gene *GmHsp22.4* foram utilizados os genótipos de soja, resistente (PI 595099) e suscetíveis (BRS 133 e Williams 82) ao nematoide de galhas *M. javanica*. A região codificadora do gene *GmHsp22.4* de cada um desses genótipos foi avaliada visando a identificação de polimorfismos. Em seguida, a região codificadora do gene, proveniente do genótipo resistente (PI 595099), foi superexpressa em raízes de soja suscetível (DOKO RC), de acordo com SILVA, et al., (2001), e em plantas de *A. thaliana* para observar a influência do gene na resposta de resistência ao patógeno.

4.2.1 Extração de DNA genômico de soja

O DNA dos genótipos selecionados para este trabalho foi extraído do tecido foliar de acordo com a técnica descrita por Doyle, et. al. (1987), utilizando cerca de 50 mg de tecido. Para a verificação da integridade do DNA, as amostras foram aplicadas em gel de eletroforese, e o armazenamento das imagens, foi utilizado o equipamento transluminador e fotodocumentador Loccus. A concentração e pureza das amostras foram determinadas em espectrofotômetro (A260/280nm e A260/230nm) utilizando UniscienceNanoDrop ® ND-1000 espectrofotômetro (Produtos Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

4.2.2 Caracterização da região codificadora

A busca de polimorfismos na região codificadora do *GmHsp22.4* entre genótipos contrastantes quanto à resistência ao nematoide foi analisada via sequenciamento. Foram utilizados os genótipos: PI 595099 resistente a *M. javanica*, e os genótipos BRS 133 e Williams 82, ambos suscetíveis.

Para as análises das sequências, foram desenhados os oligonucleotídeos específicos a partir das sequências de Williams 82, disponível no Banco de Dados Phytozome, para as regiões codificadoras do modelo gênico *GmHsp22.4*, utilizando o software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e Vector NTI Advance™ (*Invitrogen*). O amplicon de interesse apresentou tamanho de cerca de 588 pb, partindo da região *upstream* ao sítio de início da transcrição do gene. Os oligonucleotídeos obtidos foram contrastados com o banco de dados de *Glycine max* no Phytozome, para certificar a especificidade da amplificação.

O conjunto de primers obtido foi empregado na reação de PCR utilizando o Kit *Taq DNA Polymerase Invitrogen*, com o seguinte parâmetro de ciclo: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 68°C por 45 segundos e um passo adicional de 68°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese convencional, e para a aquisição e armazenamento da imagem foi utilizado o equipamento transluminador e fotodocumentador (Loccus).

A confirmação da conservação (fidelidade) da sequencia amplificada foi conduzida via sequenciamento. Para o sequenciamento do fragmento amplificado, foi utilizado o conjunto de *primers* específico para a região codante. O sequenciamento foi realizado de forma unidirecional, com kit ABI Prism®BigDye™TerminatorCyclesequencing v.2.0.(AppliedBiosystems) e a separação dos fragmentos foi feita em um sequenciador automático ABI3700 (AppliedBiosystems).

Paralelamente, a identificação do gene ortólogo de *GmHsp22.4* em *A. thaliana* foi feito via ferramenta Blast n.

4.2.3 Construção dos cassetes de expressão

Após a obtenção dos fragmentos purificados correspondentes à região codificadora do gene de interesse, foram conduzidas técnicas para a construção do cassete de expressão. O fragmento foi ligado ao vetor de entrada PCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (2012), utilizando de 0,5 a 4 µL do produto do PCR, 1 µL de Salt (na proporção de 1 Salt : 3 água), H₂O ultra pura qsp 6 µL e 1 µL de TOPO.

O produto da reação de ligação e o produto final da reação de recombinação foram utilizados para transformação de células de *Escherichia coli* (cepa DH5α) eletrocompetentes, via eletroporação. O vetor de destino pH7WG2D (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002) (Figura 1), foi utilizado para a transformação de cepas de *E. coli* (DB3.1). A seleção dos clones recombinantes foi realizada através do emprego do antibiótico spectinomicina, enquanto para o vetor de destino foi utilizado o antibiótico higromicina, ambos em concentração final de 100 µg.mL⁻¹.

A confirmação da transformação do vetor de entrada e de destino contendo o inserto, na orientação esperada, foi realizada por reações de restrição e sequenciamento. Para a reação de restrição foram utilizados os seguintes reagentes no mix: 2 µL de React (tampão) 3, 16,58 µL de água ultra pura, 0,21 µL de cada endonuclease (Nco I e EcoR V-vetor de entrada) (BamH I-vetor de destino) e 1 µL de DNA. A reação foi incubada à temperatura de 37 °C por duas horas, seguida de 4°C. As amostras foram analisadas em gel de eletroforese, considerando o tamanho do fragmento de interesse (588 bp) e o mapa do vetor de entrada, se o fragmento foi clonado corretamente são esperadas as bandas 523 pb e 2882 pb. Para o vetor de destino as bandas de 1690, 1069 e 703 pb são esperado no vetor vazio.

Para o sequenciamento dos clones do vetor de entrada e de destino, foi utilizado o conjunto de *primers* M13, forward (GTAAAACGACGGCCAG) e reverse (CAGGAAACAGCTATGAC) considerado um *primer* universal. O sequenciamento foi realizado de forma unidirecional, com kit ABI Prism®BigDye™TerminatorCyclesequencing v.2.0.(AppliedBiosystems) e a separação dos fragmentos foi feita em um sequenciador automático ABI3700 (AppliedBiosystems).

Após a seleção de pelo menos uma colônia que apresentasse o inserto na orientação e sequência esperada, foi conduzida a extração de DNA plasmidial

Midiprep com o Kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification para ser utilizado na reação de recombinação, que consistiu de 2 µL de Tampão LR clonase, 1 µL de TE pH 8,0, 3 µL do vetor de entrada com inserto, 2 µL do vetor de destino (pH7WG2D) e 2 µL da enzima de LR clonase. Após a adição da LR clonase, as amostras foram levemente vortexadas e incubadas a 25°C *overnight*. Antes do término da reação, foi adicionado 1 µL de Proteinase K e as amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos.

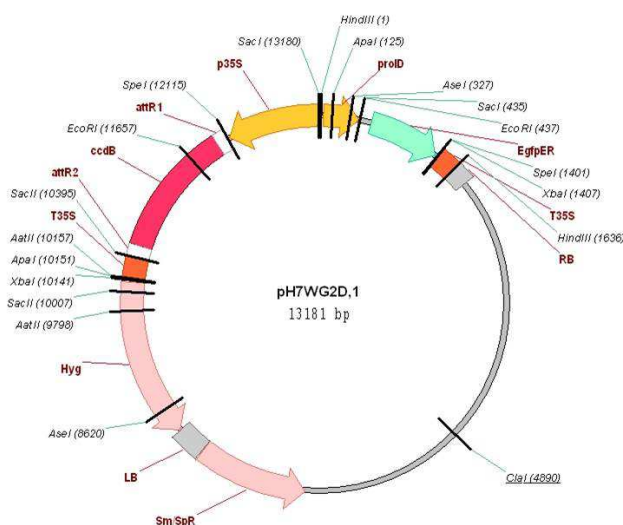


Figura 1: Mapa do vetor gateway (pH7WG2D), utilizado para as transformações de raízes de plantas de soja e *A.thaliana*, via *A. rhizogenes* e análise da influência da região codificadora do gene em estudo na resposta ao estresse por nematoide. RB (*RightBorder*) e LB (*LeftBorder*), para a transformação das plantas. p35S, promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, promotor altamente ativo em plantas. *attR1* e *attR2*, sítios de recombinação. *ccdB*, gene de morte, codifica proteína inibidora da proteína girase. T35S, terminador do vírus do mosaico da couve-flor. *EgfpER*, codifica proteína de fluorescência verde (GFP). *Hyg*, resistência ao antibiótico higromicina. *Sm/SpR*, resistência aos antibióticos estreptomicina e espectomicina.

4.2.4 Transformação de *Agrobacterium rhizogenes* k599 e *Agrobacterium tumefaciens* gv3105

As construções de pH7WG2D contendo os fragmentos de interesse corretamente clonados foram utilizados para transformar as cepas de *A. rhizogenes* K599 e *A. tumefaciens* gv3105. A transformação foi via eletroporação utilizando o eletroporador *MicroPulser* (*Bio-Rad*) com o programa A9r, preparado para 2,2 kV, 25 µF, com controlador de 1 pulso para 200 ou 400 ohms. Foram utilizados 60 ng do produto da reação de ligação (DNA) e 40 µL de células eletrocompetentes de ambas

Agrobacterium. A recuperação das células foi realizada crescendo a suspensão de bactérias em 1 mL de meio YEP líquido (sem antibiótico e aliquoteado no fluxo laminar esterilizado), em tubo *Falcon* de 15 mL estéril, incubadas a 28°C, por 2 h sob agitação de 250 rpm. Após este período, 100 µL de células eletroporadas foram plaqueadas, em fluxo laminar esterilizado, em meio YEP sólido contendo Gentamicina (resistência da *A. tumefaciens*) ou espectinomicina (resistência da *A. rhizogenes*), 100 µg.mL⁻¹ de Hygromycina (resistência do vetor de destino). Ao final, as placas foram incubadas a 28 °C *overnight*.

Para a confirmação dos clones positivos, foram realizadas PCRs utilizando o conjunto de *primers* específicos para o vetor, presente no vetor de destino, como descrito no item 4.2.3.

4.2.5 Transformação de raízes de soja suscetível (Doko RC) via *A. rhizogenes*

Para a transformação de raízes de soja por *A. rhizogenes* (cepa K599), foi utilizada a cultivar DOKO RC tendo como base o procedimento descrito por Li; Todd, Trick (2010), adaptada perante o meio ½ MS sólido [8 g/L de ágar, ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina Gamborg B5, 1,90 g.L⁻¹ MES, pH 5,7] para a germinação.

Para preparo do inóculo, uma colônia de clones recombinantes de *A. rhizogenes* foi cultivada em meio YEP (10g/L de peptona bacteriológica, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, com ajuste do pH para 7,0) contendo os antibióticos espectinomicina e higromicina com concentração de 100 µg/mL.

As transformações foram realizadas com 100 sementes da cultivar DOKO RC para o tratamento não transformado, transformado com o vetor vazio e transformado com o gene de interesse, enquanto 50 plântulas (PI 595099) foram utilizados como resistente, utilizando sementes com 5 dias de desenvolvimento após a germinação, totalizando 350 plântulas.

A inoculação da *A. rhizogenes* na raiz de soja foi realizada após a remoção da radícula, com um corte na região de separação entre o hipocótilo e a radícula, seguindo a injeções do inóculo na região do hipocótilo e cultivo em meio de co-cultivo sólido [6g /L de ágar, ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina GamborgB5, 1,90 g/L MES, 5 g/L de sacarose, 1 mL/L de Dithiothereitol [1M] e Tiosulfato de sódio [1M], pH 7,0) (Figura 2).

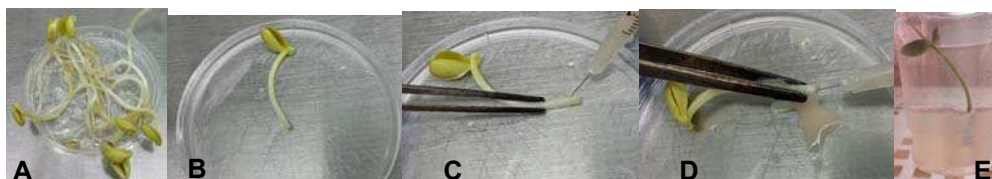


Figura 2: Sequência das etapas da transformação de raízes de soja com *A. rhizogenes*. A) Sementes com 5 dias de germinação. B) Excisão da radícula dos embriões a serem transformados. C e D) Inoculação das bactérias recombinantes nos embriões via injeção, de forma paralela ao feixe vascular. E) Plantas em meio de co-cultivo (meio contendo antioxidantes e vitamina).

Como controles foram utilizadas plantas não transformadas, a fim de verificar a diferença de desenvolvimento das plantas e das raízes transformadas e não transformadas. Estas passaram pelo mesmo processo de transformação, utilizando sementes germinadas de 5 dias, sendo injetada água ao invés de *A. rhizogenes*.

Após sete dias de co-cultivo, as plantas foram transferidas para um meio de seleção [8 g/L de ágar, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina B5, 1,90 g/L MES, 5 g/L de sacarose, pH 5,7] contendo 100 µg/mL de cefotaxime, onde foram mantidas por 10 dias.

Paralelamente à seleção com o auxílio de antibióticos, as raízes transformadas também foram inspecionadas e selecionadas baseado-se na observação visual da expressão da proteína GFP (*Egfp*), em microscópio de fluorescência Leica MZIII (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). As raízes não transformadas foram excisadas e as plantas que não apresentaram raízes transformadas foram descartadas. Os filtros empregados para a detecção de *Egfp* apresentam um módulo de fluorescência que contém uma lâmpada Leica 106Z de 50 ou 100 W de alta pressão e vapor de mercúrio, e dois conjuntos de filtros para *Egfp* (470/40 nm).

Após a seleção, as plântulas quiméricas foram transplantadas para uma etapa adicional de hidroponia para aclimação, por aproximadamente 10 dias, visando a recuperação do sistema radicular. O sistema de hidroponia foi montado em bandejas de capacidade para 25 litros, com oxigenação através de compressores de ar adequados para a oxigenação do volume de solução nutritiva (606,6 mg/L KNO₃, 944,6 mg/L Ca(NO₃)₂.4H₂O, 230,06 mg/L NH₄H₂PO₄, 492,96 mg/L MgSO₄.7H₂O, 0,724 mg/L MnCl₂.4H₂O, 0,08 mg/L CuSO₄.5H₂O, 2,86 mg/L H₃BO₃, 0,017 mg/L MoO₃, 0,22 mg/L ZnSO₄.7H₂O e 4,47 mg/L Fe EDTA) utilizada conforme estabelecida por Kuma (2014).

Após serem retiradas da hidroponia, foi realizada uma nova seleção baseada na observação visual da expressão da proteína *Egfp*, para a retirada dos escapes de raízes não transgênicas. Em seguida, as plantas quiméricas foram transferidas para tubetes contendo uma mistura de areia e terra e cultivadas em casa de vegetação.

4.2.6 Transformação de *A. thaliana* pelo método floral-deep (HARRISON, et.al., 2006).

As *A. thaliana* foram cultivadas em fitotron à temperatura de 21°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e umidade de 90%. Após os crescimentos da haste, cerca de 20 dias após a germinação, as inflorescências foram cortadas aliviando a dominância apical, na tentativa de obter mais gemas florais por planta (Figura 3).

As bactérias foram cultivadas até a fase estacionária em cultura líquida a 25-28 °C, 250 rpm em YEP adicionado gentamicina (60 mg ml⁻¹). Foi realizado um pré-inoculo, seguida de um inoculo para o preparo do meio de infiltração, contendo 5,0% de sacarose e Silwet L-77. Para a ressuspensão, foram utilizados 250 mL de solução de infiltração, para atingir uma OD de 0,6.



Figura 3: Cultivo das plantas de *A. thaliana*. A) Mudanças de *A. thaliana* cultivada em vasos contendo o substrato SunShine, cada tratamento realizado em triplicata. B) Corte das inflorescências para obtenção de maior número de gemas florais. C) Mudanças de *A. thaliana* após o corte das inflorescências.

Após as plantas de *A. thaliana* atingirem o estágio de florescência, foram mergulhadas, com suave agitação, por 3-5 segundos em solução de infiltração contendo *A. tumefaciens* com o vetor de destino (Figura 1S). Para manter a umidade, durante 24 horas, as plantas foram cobertas com plástico transparente.

Posteriormente à inoculação por *Agrobacterium*, as plantas foram mantidas em condições de crescimento normal, mantendo-se separadas dos vasos vizinhos

através de isolamento, até a coleta das sementes e armazenamento em microtubos a 4 °C sob dessecação (Figura 2S).

Para seleção das sementes transformadas, foi inicialmente tratada em fluxo laminar com solução de esterilização (3 mL de hipoclorito de sódio comercial (5%); 7 mL de água destilada e 10 µL SDS 10%), seguido de seis lavagens com água esterilizada.

Os eventos positivos foram adquiridos através da utilização de meio de seleção contendo 1/2x meio MS (Sigma Chemicals n°m-5519), 0,8% de ágar (Sigma Chemicals n°A-1296), 15 µg/mL⁻¹ de higromicina. As placas de seleção seguiram assim para a superação da dormência, durante 4 dias a 4°C no escuro, em seguida expostas à luz de 50-100m Einstein dm⁻²s⁻¹ por 8 horas em ambiente controlado a 23°C, retornando novamente no escuro durante três dias, porém a temperatura de 23°C, e por fim, foi cultivado em luz constante por mais três dias.

Os transformantes foram identificados como mudas resistentes à higromicina quando não apresentaram retardo no crescimento (Figura 4). Os indivíduos sem retardo de crescimento foram cultivados até à maturidade, de preferência, após o desenvolvimento de 3-5 folhas adultas, seguindo para o solo (1 parte de areia e 4 partes de Vermiculita) previamente umedecido com solução nutritiva. As plantas foram cultivadas sob uma cúpula por aproximadamente uma semana e, depois, voltando ao crescimento normal. Os eventos positivos foram confirmados via PCR, e então reproduzidas até linhagem T2, para então serem utilizadas nos bionsaios com nematoides.

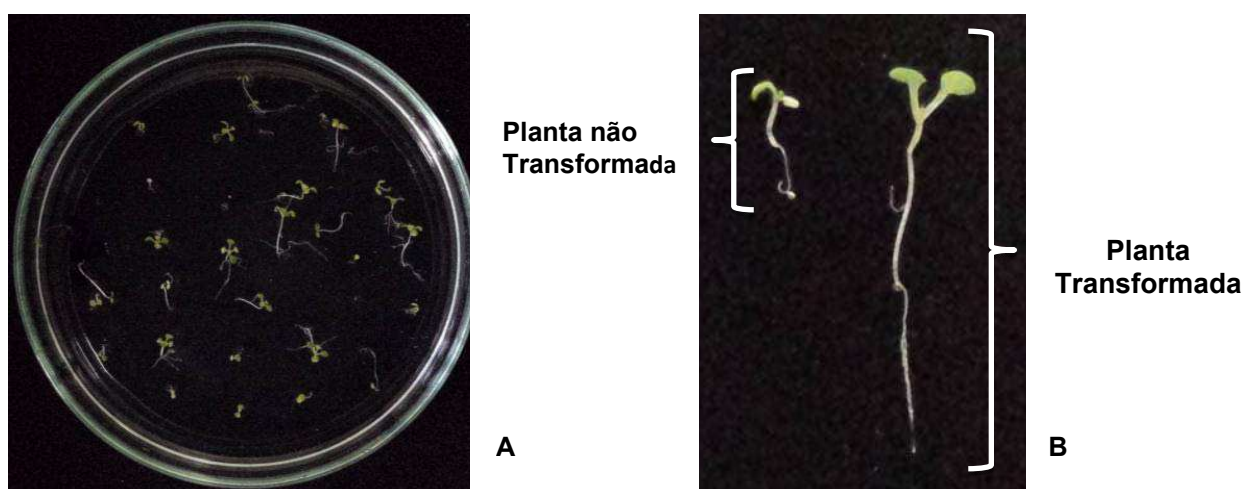


Figura 4: Seleção das plantas de *A. thaliana* transformadas. (A) Cultivo de *A. thaliana* em placa de seleção contendo higromicina. (B) Plantas de *A. thaliana* transformadas, localizadas à direita da figura e plantas de *A. thaliana* não transformadas, localizadas à esquerda da figura.

4.2.7 Bionsaio com nematoides

Plantas de *A. thaliana* e de soja contendo raízes superexpressando o gene *GmHsp22.4* foram utilizadas nos bioensaios com nematoides.

O experimento utilizando as plantas de sojas quiméricas seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com doze repetições (KUMA, 2014), e estrutura de tratamentos em dois fatores: tempo de coleta (8 e 54 dias após inoculação - dpi), genótipos (suscetível, resistente) e dois eventos de transformação: um transformado com o vetor vazio (G2D) e outro contendo a região codificadora do gene de interesse (*GmHsp22.4*). No total, foram utilizados 108 tubetes contendo uma planta cada.

O experimento com plantas de *A. thaliana* transformadas seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 12 repetições (CURTIS, et.al., 2012) visando a comparação entre os genótipos selvagem e 3 eventos de transformação (CURTIS, et.al., 2012) para cada construção: vetor vazio (G2D) e contendo a região codificadora do gene de interesse (*GmHsp22.4*). No total, foram utilizados 70 tubetes contendo uma planta cada.

A população de *M. javanica* foi multiplicada na casa de vegetação do Setor de Nematologia da Embrapa Soja, em plantas de soja, por três meses. Utilizando a técnica de Bonetti e Ferraz (1981), as plantas de soja foram processadas, lavadas, cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador, para extração dos nematoides. Em seguida, as amostras foram peneiradas em peneiras com meshs de 200 e 500, lavadas com água corrente e o conteúdo retido na peneira de 500 mesh (ovos e larvas) foi recuperado em Becker. Em câmara de eclosão, os J₂ viáveis foram coletados a cada dia, durante três dias, em frasco de Erlenmeyer. O material obtido na extração e eclosão foi quantificado em lâmina de Peters, utilizando-se 1 mL da suspensão para a projeção do número total de indivíduos para que os inoculo fossem ajustados para conter 125 indivíduos.mL⁻¹ no experimento.

A inoculação de cada planta foi feita através de pipetagem de 4 mL de larva juvenis (J₂) de *M. javanica* junto às raízes, através de um pequeno orifício aberto ao lado da raiz da planta, totalizando cerca de 500 nematoides por planta de soja e 400 nematoides por planta de *A. thaliana*.

Após 54 dpi (KUMA, 2014) e 22 dpi (CURTIS, et.al., 2012) da infecção do patógeno nas raízes de soja e em *A. thaliana*, respectivamente, as raízes foram coletadas e pesadas individualmente, para ajuste do cálculo do número de nematoides por grama de raiz. As raízes quiméricas de soja foram ainda coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferidas para ultrafreezer a -80°C , para posterior extração do RNA.

Para o experimento com a soja, foi realizado, a contagem das massas de ovos e de galhas, localizadas na superfície das raízes, após a coloração com floxina B (TAYLOR; SASSER, 1978). A extração de ovos + J_2 do nematoide de galha, foram processadas de acordo com a técnica de Bonetti e Ferraz (1981). A contagem foi realizada na lâmina de Peters com o auxílio de microscópio óptico e o número de ovos foi utilizado no cálculo do fator de reprodução (FR), sendo este, divisão da população final pela população inicial (inoculada) do nematoide em cada planta.

Já para o experimento com a *A. thaliana* foi realizada a contagem das fêmeas adultas, localizadas nas raízes, após a coloração com a fucsina ácida (TAYLOR; SASSER, 1978). Todos os parâmetros avaliados foram comparadas entre as plantas transformadas com o vetor vazio e as transformada com o gene *GmHsp22.4*, em ambas as espécies. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t e as médias comparadas por *Jockey* 5%

4.2.8 Quantificação da expressão do gene *GmHsp22.4* via RT-qPCR

Para garantir que todas as raízes estejam transformadas, os níveis de expressão do gene de interesse *GmHsp22.4*, regulado pelo promotor 35s, foi quantificado por qRT-PCR a partir do cDNA proveniente de cada planta de soja quimérica utilizada no experimento.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (1 mL/100 mg tecido), conforme recomendações do fabricante (Invitrogen). Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima Desoxiribonuclease I (Kit Invitrogen - DNase I), conforme a recomendações do fabricante, a fim de eliminar qualquer molécula de DNA presente na amostra. O RNA tratado seguiu para a etapa de síntese de cDNA, utilizado o Kit SuperScript III (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em termociclador ABI PRISM® 7500 SequenceDetection System (AppliedBiosystems) utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems), conforme as instruções do fabricante. Como normalizador, foi utilizado o gene de ELF-1 β (Tabela 1), enquanto as plantas transformadas com o vetor vazio foram empregadas como calibradoras, em cada tratamento correspondente. Os níveis de expressão do gene *Egfp* nas plantas transformadas com vetor vazio e com o gene de interesse *GmHsp22.4* foram determinados como controle.

Tabela 1: Sequencias dos primers utilizados para o PCR em tempo real.

Primers	Sequencia
ELF-1β	5'-GTTGAAAAGCCAGGGCACA-3' 3'-TCTTACCCCTTGAGCGTGG-5'
EGFP	5'-TGACCCTGAAGTTCATCTGG-3' 3'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-5'
GmHsp22.4	5'- CCTATCTAGAATGTTCTTTACCTTTTCG-3' 3'- TTCTAGTACTAAGGGAAGATGTGGC-3'

A eficiência da reação de amplificação para cada par de iniciadores dos genes estudados (Tabela 1) e do normalizador foi estimada através de uma série de diluições do cDNA (10^{-1} a 10^{-4}), onde foram testadas diferentes concentrações finais dos primers (0,14 μ M, 0,16 μ M, 0,2 μ M, 0,24 μ M). Os valores de Ct obtidos foram plotados em função do logaritmo das diluições, e o índice de inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema de acordo com a fórmula $E = [10^{-1/\text{slope}}]^{-1}$.

As determinações dos níveis de expressão dos genes alvos foram realizadas pela quantificação relativa, utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores de quantificação relativa e análise estatística, nível de significância igual a 5%, foram determinados utilizando-se o teste t.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização da região codante do gene *GmHsp22.4* em soja.

A partir dos resultados de sequenciamento Sanger da região codificadora do gene *GmHsp22.4*, a comparação da sequência alinhada dos genótipos resistente (PI 595099) e suscetíveis (Williams 82 e BRS 133) não revelou nenhum polimorfismo (Figura 5).

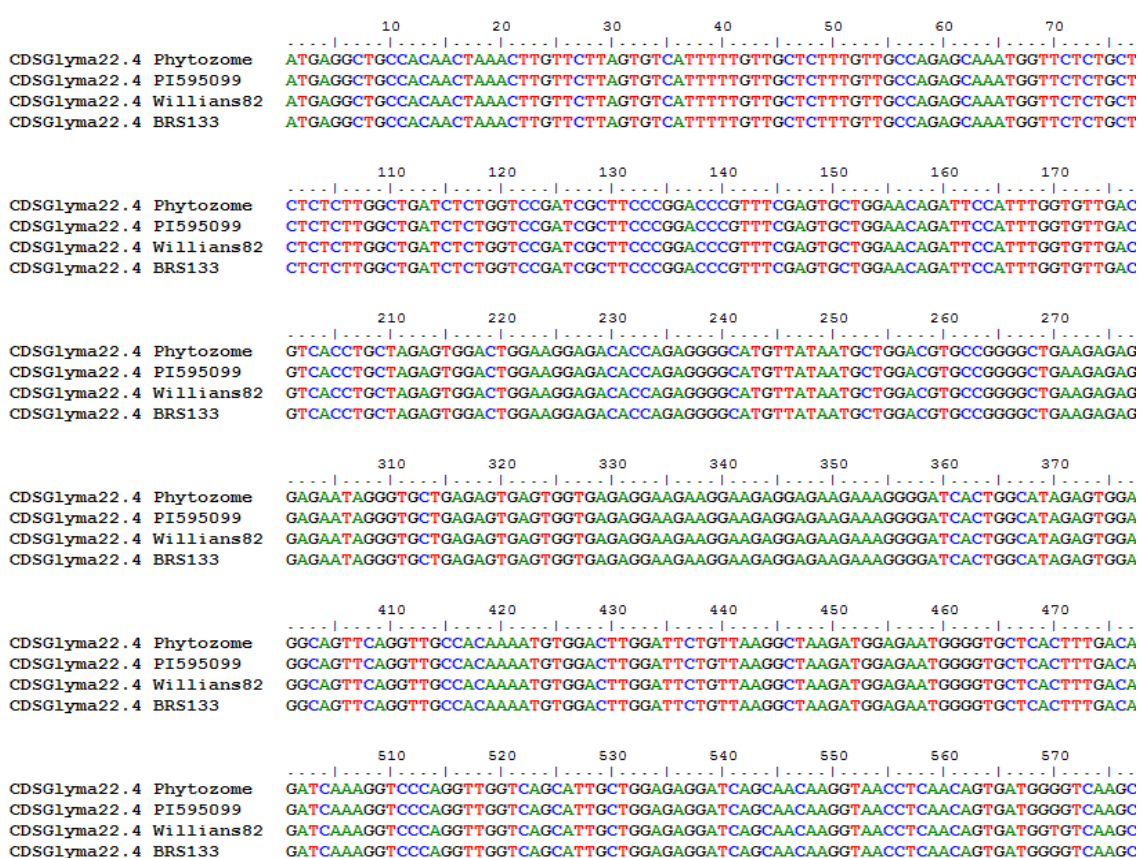


Figura 5: Alinhamento da sequência da região codificadora do gene *GmHsp22.4* de soja nos genótipos PI 595099, Williams 82 e BRS 133 por meio do programa Bioedit

4.3.2 Confirmação da transformação de *E. coli*

As construções da região codante do genótipo resistente (PI 595099) e suscetíveis (Williams82 e BRS133) foram obtidas pela transformação da *E. coli* e confirmação do inserto, na posição correta no vetor, pela reação de restrição com as

endonucleases *Nco* I e *EcoR* V para o vetor de entrada, e *Bam*H I para o vetor de destino.

A enzima *Nco* I clivou exatamente à 873 pb do fragmento da região codante e a enzima *EcoR* V à 1396 pb do vetor TOPO, assim, por meio do tamanho da banda no gel de agarose, pode se observar a entrada do fragmento na posição correta (Figura 6).

A clivagem das duas regiões com o inserto na posição correta apresentou um tamanho de banda de 523 pb e 2882 pb. Por outro lado, as clivagens que ocorreram com o inserto na posição invertida apresentaram um tamanho de banda de 317 pb e 3088 pb. Contudo, quando ocorreu a transformação da *E. coli* apenas com vetor sem o fragmento, observou-se somente uma banda de 3405 pb.

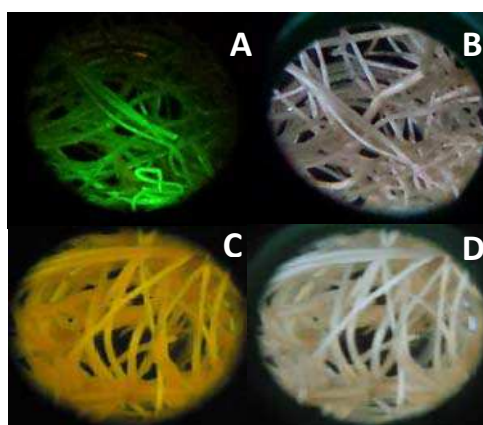
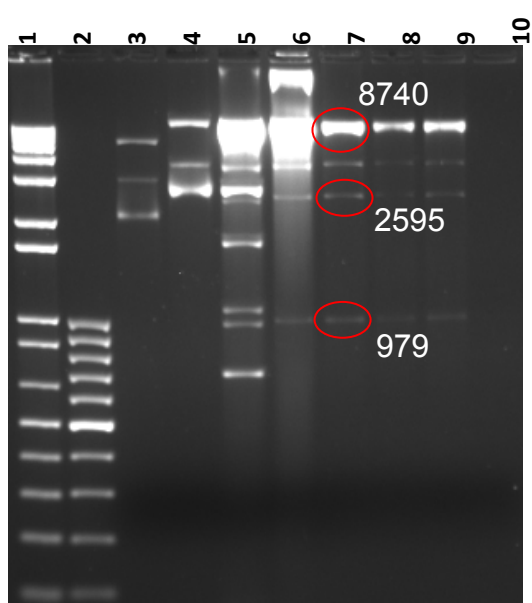
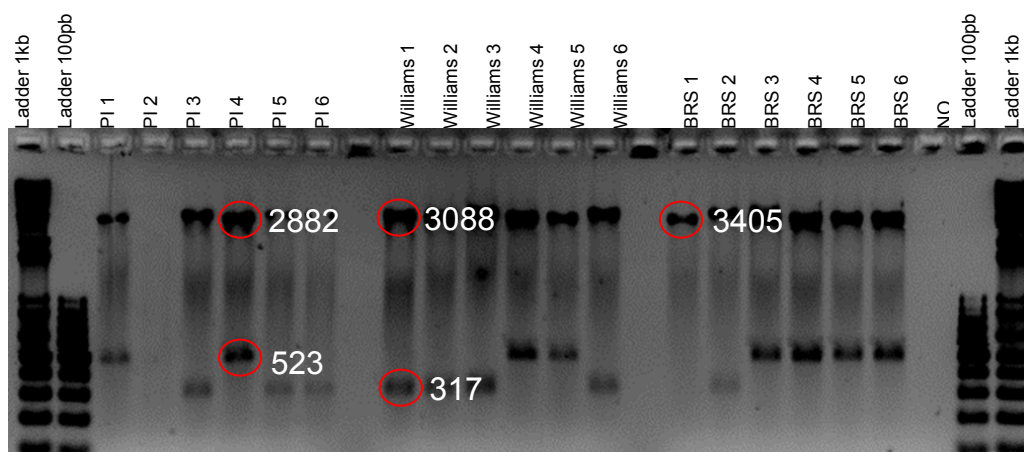


Figura 6: Confirmação da clonagem de *E.coli* e da transformação das raízes de soja via *A. rhizogenes*. (I) Perfil de restrição do DNA plasmidial TOPO com as endonucleases *Nco I* e *EcoR V*. (II) Perfil de restrição do DNA dos clones do vetor pHGW2D com a enzima *BamH I* para confirmação da recombinação. (1) Ladder 1kb plus. (2) Ladder 100pb. (3) TOPO vazio. (4) TOPO + gene *GmHsp22.4*. (5) pH7WG2D. (6) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-1* repetição. (7) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-2* repetição. (8) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-3* repetição. (9) pH7WG2D + Gene *GmHsp22.4-4* repetição. (10) negativo. (III) Expressão do marcador GFP nas raízes transformadas. (A) Visualização das raízes transformadas sob a fluorescência ao estereomicroscópio com filtro GFP. (B) Mesma raiz de A visualizada sob uma luz normal. (C) Visualização das raízes não transformadas sob o filtro GFP. (D) Mesma raiz de C visualizada sob luz normal.

Baseado nestes resultados, foram obtidos os clones PI 1 e 4; Williams 4 e 5; BRS 3, 4, 5 e 6, na posição correta, enquanto que os clones PI 3, 5, e 6; Williams 1,2,3 e 6; BRS 2, na posição invertida no vetor. No caso do genótipo BRS 1, houve a transformação apenas com o vetor vazio, já que apresentou apenas uma banda na altura de 3405 pb (figura 6-I).

A confirmação do inserto recombinado com a região codificadora no vetor de binário de destino (pH7GW2D) também foi analisada pela reação de restrição com a endonuclease (*BamH I*) (Figura 6-II). Os clones com o inserto correto, apresentaram apenas as bandas de 8740, 2595 e 979 pb (Figura 6-II-6, 7, 8 e 9). Os vetores de entrada vazio e com o gene *GmHsp22.4* também apresentaram um perfil diferente (Figura 6-II- 3 e 4).

4.3.3 Eficiência de transformação de raízes de soja com *A. rhizogenes* e de *A. thaliana* com *A. tumefaciens*

As raízes de soja transformadas foram selecionadas pela observação da fluorescência emitida pela proteína GFP, expressa pelo gene contido no vetor de destino, pH7WG2D. As raízes das plantas transformadas com o vetor vazio e o pH7WG2D+*GmHsp22.4* apresentam-se verde-fluorescentes quando expostas sob luz no comprimento de onda de 475 nm, na faixa da luz azul do estereomicroscópio (Figura 6).

A eficiência de transformação das raízes de soja foi de 32% para o vetor vazio e 24% para o gene *GmHsp22.4*, sendo levadas para a etapa de infecção com nematoides 28 plantas transformadas com o vetor vazio e 24 plantas transformadas com o gene de interesse.

Ao se avaliar o percentual de raízes transformadas por planta, a média baseada na análise qualitativa/visual da expressão de GFP foi de 76% para o vetor vazio e 77% para o gene *GmHsp22.4* (Tabela 2). Assim, não se observou visualmente diferença entre o percentual de raízes transformadas pela análise da expressão de GFP, obtendo-se um valor considerável de raízes transformadas por planta para ambas as construções.

Tabela 2: Porcentagem de raízes/planta com a fluorescência verde brilhante (GFP) nos diferentes genótipos.

Genótipos	Média GFP (%)
PI*	0
NT*	0
Vetor vazio G2D	76
<i>GmHsp22.4</i>	77

*PI e NT – Plantas não transformadas

Anteriormente à transformação de *A. thaliana*, foi verificada se o gene *GmHsp22.4* apresenta alguma semelhança com os genes de *A. thaliana*, assim foi utilizado a ferramenta blast n para a busca do gene ortólogo de *GmHsp22.4* em *A. thaliana*, ou seja, algum gene que apresente atividade de chaperona parecida ao encontrada em soja. Como resultado verificou-se que o gene *AT4g10250* apresenta uma identidade de 74,6%, logo o gene transformado em *A. thaliana* não seria totalmente estranho para planta e a resposta a ser obtida quando da superexpressão poderia ser similar à observada em soja.

As plantas de *A. thalianas* transformadas e selecionadas com o antibiótico higromicina foram confirmadas via PCR utilizando DNA genômico extraído das raízes e primers específicos para a região promotora *p35s*, para demonstrar a transferência do T-DNA (Figura 7). Todas as raízes transgênicas apresentaram um fragmento de interesse, tanto para o gene *GmHsp22.4* (Figura 7A) quanto para o vetor vazio (Figura 7B), com exceção da 12ª amostra do 1º evento transformado com Col-0:*GmHsp22.4* (Figura 7A) que não apresentou nenhuma banda e não foi utilizada para o teste de fenotipagem. Já para as plantas não transformadas (selvagem) (Figura 7C), como esperado, não apresentaram nenhum fragmento amplificado.

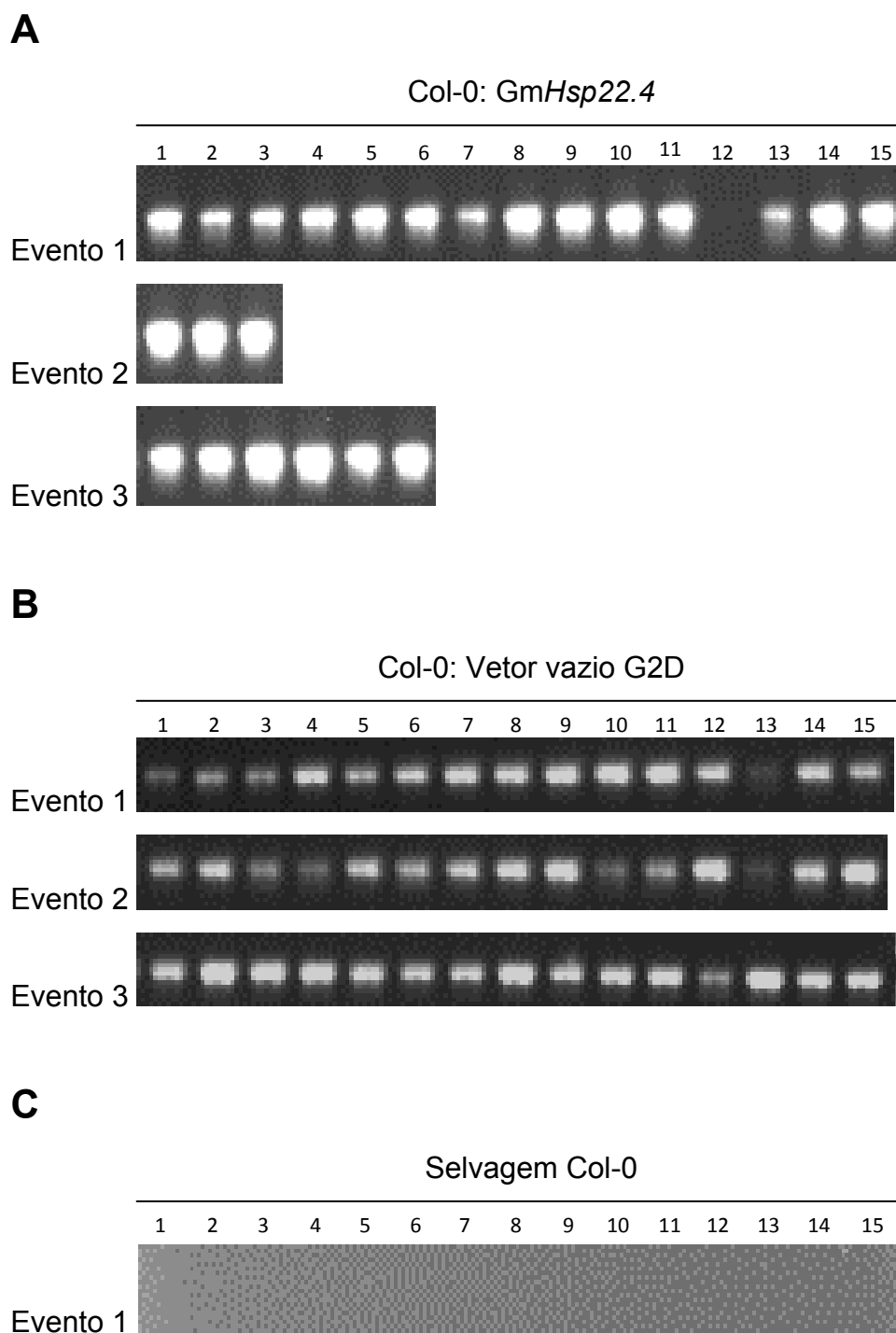


Figura 7: Resultado da reação de PCR das raízes de *A. thaliana* transformadas com o gene *GmHsp22,4*; vetor vazio G2D e não transformadas (selvagem). **A** Resultado da amplificação das 15 independentes raízes transgênicas transformadas com o Col-0:*GmHsp22,4* para o 1 evento (1-15); 2 evento (1-3) e 3 evento (1-6). **B** Amplificação das 15 independentes raízes transgênicas transformadas com o Col-0:vetor vazio G2D para os três eventos. **C** Amplificação das 15 independentes raízes transgênicas transformadas com a Selvagem Col-0.

Para garantir que todas as plantas estavam expressando o gene de interesse, seus níveis de expressão em soja foram também medidos via RT-qPCR, em cada planta individualmente, após 8 e 54 dpi com *M. javanica* (KUMA, 2014). Como controle, foi utilizado o gene *Egfp*, que está presente no vetor pH7WG2D, logo em todas as plantas de soja transformadas (com e sem o gene de interesse) sua expressão não deveria ser influenciada após a inoculação do nematoide. Como esperado, foram detectados altos níveis de expressão do gene *GmHsp22.4* nas plantas de soja transformadas com o gene alvo, regulado pelo promotor 35S, tanto aos 8 como 54 dpi, sendo que o nível de expressão do gene controle, *Egfp*, não apresentou variação. Porém, ao analisar o desvio padrão, pode-se observar uma grande variação entre os eventos, na qual, a expressão do *GmHsp22.4* aos 8 dpi apresentaram um desvio padrão de 1279,23 e à 54 dpi o valor elevou para 66607,51 (Tabela 3).

Proporcionalmente, a variação nos níveis de expressão de GFP não alterou em comparação ao gene de interesse, sendo esse valor a oito dpi de 2,42 e à 54 dpi de 45,88.

Tabela 3: Valores da massa de ovos, número de galhas, fator de reprodução e nível de expressão do gene *GmHsp22.4* após a infecção do nematoide *M. javanica* a 8 e 54 dpi nas raízes de soja transformada e não transformada com o respectivo gene.

Eventos	DOKO RC NT			DOKO RC:G2D Vetor vazio			DOKO RC: <i>GmHsp22.4</i>						
	*Massa de ovos	*Número de galhas	*FR	*Massa de ovos	*Número de galhas	*FR	*Massa de ovos	*Número de galhas	*FR	Gene <i>GmHsp22.4</i>		Gene <i>Egfp</i>	
										RQ 8 dpi	RQ 54 dpi	RQ 8 dpi	RQ 54 dpi
1	10,48	9,76	4,74	4,06	3,75	2,55	0,83	0,83	0,70	432,87	211995,86	1,00	89,67
2	10,30	8,18	7,53	4,67	4,33	1,97	5,37	5,37	2,98	353,58	2123,67	0,54	4,30
3	9,18	8,36	5,25	5,79	3,86	3,85	2,08	2,92	1,33	1457,58	765,91	0,67	11,85
4	9,55	8,33	4,73	0,71	0,71	0,70	6,51	4,65	3,51	13,88	6515,31	0,67	0,06
5	11,91	11,91	5,30	4,17	3,96	3,64	5,77	4,23	2,16	1190,57	712,10	2,25	0,88
6	8,17	7,50	2,00	5,00	4,00	2,51	8,33	7,14	5,94	-	-	-	-
7	10,43	12,03	5,40	2,88	2,69	1,62	1,54	1,28	1,30	4008,91	671,52	7,56	13,99
8	5,95	5,95	2,21	2,05	2,05	1,01	2,20	2,03	0,89	1784,48	-	3,37	-
9	22,56	16,28	7,96	4,81	3,51	1,48	1,63	1,40	1,17	529,96	448,02	0,82	130,39
10	10,00	8,21	6,26	9,83	8,83	2,25	3,26	2,39	1,89	-	1437,08	-	1,18
11	20,31	17,50	9,78	3,75	3,75	2,16	0,00	5,16	2,03	-	330,74	-	0,07
12	22,90	16,13	14,92	0,00	1,05	0,70	0,28	0,28	0,15	-	35,00	-	1,71
Média	12,65^b	10,85^b	6,34^b	3,98^a	3,54^a	2,04^a	2,68^a	2,78^a	1,65^a	-	-	-	-
DP	5,81	3,90	3,49	2,55	2,05	1,02	2,70	2,14	1,56	1279,23	66607,51	2,42	45,88

Valores seguidos por uma mesma letra, entre os genótipos, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. *Valores por g de raiz. Letras maiúsculas, minúsculas e em minúsculo itálico fora utilizadas para comparações entre Massa de ovos, Numero de galhas e FR (população final/população inicial), respectivamente.

Normalizador = ELF1 β (KUMA, 2014); Calibrador = plantas transformadas com o vetor vazio G2D; Método utilizando = 2_ $\Delta\Delta$ QTbter o valor de RQ; FR = Fator de reprodução; DP = Desvio Padrão.

4.3.4 Caracterização morfológica dos eventos de *A. thaliana*

A caracterização morfológica dos eventos permitiu detectar diferenças estatisticamente significativas do 2º e 3º eventos superexpressando o gene do *GmHsp22.4* comparados aos demais na (Figura 8-A). Tal efeito levou ainda ao retardo no desenvolvimento, sendo os 2º e 3º eventos retardaram o período de florescimento em 8 dias (Figura 8-B).

Ao se analisar o peso da parte aérea, os 2º e 3º eventos superexpressando o gene do *GmHsp22.4* apresentaram peso da parte aérea significativamente menor em relação aos outros genótipos, sendo este valor de 0,54 e 0,67 g, respectivamente. (Tabela 4).

Quando se comparou o comprimento da raiz, o 1º e 2º evento da planta transformada com o gene foi significativo em relação ao Col-0: vetor vazio G2D e selvagem Col-0, apresentando valor de 10,69 e 9,50 respectivamente. Entretanto o 2º evento da Col-0: *GmHsp22.4* não foi significativo quando comparado com o 3º evento do Col-0: vetor vazio G2D. Na (Figura 8-B) observa claramente a diferença de tamanho do 2º evento do Col-0: *GmHsp22.4* em relação ao outros genótipos. Entre os Col-0: vetor vazio G2D nota o maior comprimento no evento 2, confirmando os dados da tabela, assim como o comprimento semelhante do 1º e 3º evento do Col-0: vetor vazio G2D e o 3º evento do Col-0: *GmHsp22.4*.

A

1 Evento



2 Evento



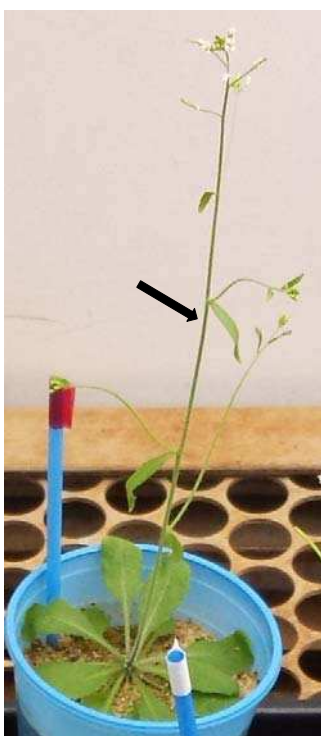
3 Evento

Col-0: *GmHsp22.4*

Col-0: G2D Vetor Vazio

Selvagem Col-0

10 dias após a germinação

Col-0: *GmHsp22.4*

Col-0: G2D Vetor Vazio



Selvagem Col-0

18 dias após a germinação

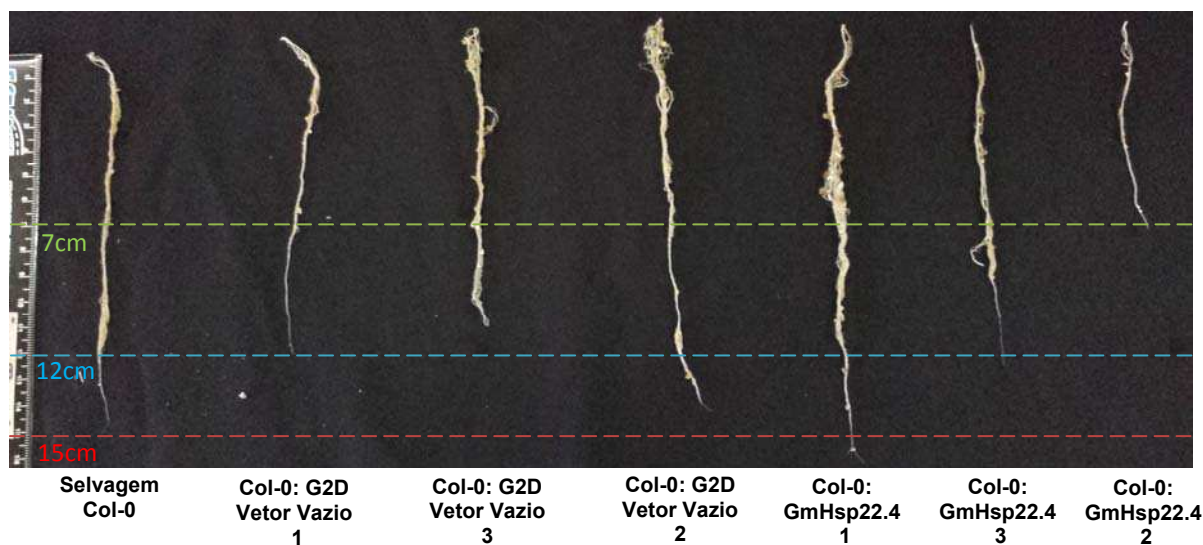
B

Figura 8: Alteração morfológica das plantas de *A. thaliana* transformadas com o gene *GmHsp22.4*, Vetor vazio G2D e como controle a selvagem. **A)** Comparação do desenvolvimento da *A. thaliana* em Col-0: *GmHsp22.4*, Col-0: G2D Vetor Vazio e Selvagem Col-0, após 10 dias. *A. thaliana* transformada com o gene foi o que apresentou maior retardo no crescimento em relação ao vetor vazio e selvagem e, após 45 dias da germinação. *A. thaliana* transformada com o gene não apresentava o desenvolvimento das inflorescências comparadas com o vetor vazio G2D e selvagem. **B)** Diferença no crescimento da raiz de *A. thaliana* transgênicas e selvagem.

Já ao analisar o peso da raiz, na grande maioria, não observou uma diferença significativa, apenas quando foi comparado o 2º evento do Col-0:*GmHsp22.4* ao 2º evento do Col-0:Vetor vazio G2D e selvagem, além da comparação do 3º evento Col-0:*GmHsp22.4* e 2º evento do Col-0:Vetor vazio G2D (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação das características morfológicas das *A. thaliana* transgênica Col-0:*GmHsp22.4*, Col-0:Vetor vazio G2D e plantas não transformadas (selvagem).

Ev.	Selvagem Col-0			Col-0: G2D Vetor Vazio 1			Col-0: G2D Vetor vazio 2			Col-0: G2D Vetor vazio 3			Col-0: GmHsp22.4 1			Col-0: GmHsp22.4 2			Col-0: GmHsp22.4 3		
	P.A.	C.R.	P.R.	P.A.	C.R.	P.R.	P.A.	C.R.	P.R.	P.A.	C.R.	P.R.	P.A.	C.R.	P.R.	P.A.	C.R.	P.R.	P.A.	C.R.	P.R.
1	0,73	16,5	0,13	1,14	13,5	0,09	0,81	16,5	0,26	1,05	13,4	0,29	1,39	1,8	0,41	0,52	9,0	0,11	0,42	16,0	0,18
2	1,06	25,0	0,41	1,19	14,5	0,58	1,04	16,0	0,30	1,29	11,0	0,12	1,00	15,5	0,20	0,55	10,0	0,02	0,92	15,0	0,28
3	0,49	19,0	0,11	0,87	15,5	0,23	1,29	21,0	0,73	1,03	16,0	0,36	1,31	15,0	0,09	-	-	-	0,48	6,5	0,02
4	1,39	16,0	0,20	1,05	18,0	0,39	1,03	19,5	0,35	1,02	19,0	0,33	0,99	18,0	0,51	-	-	-	0,54	20,0	0,16
5	0,88	19,0	0,31	0,92	11,5	0,15	0,91	12,5	0,16	1,26	17,5	0,29	0,59	11,0	0,11	-	-	-	0,69	13,5	0,11
6	1,37	20,0	0,55	0,94	13,0	0,20	1,00	17,5	0,54	0,89	17,5	0,36	0,84	9,0	0,26	-	-	-	0,94	21,5	0,36
7	0,81	12,5	0,12	1,06	18,0	0,43	1,02	20,0	0,34	0,80	8,0	0,09	0,85	9,0	0,45	-	-	-	-	-	-
8	1,02	20,0	0,42	1,14	9,8	0,20	1,05	17,0	0,47	0,97	17,5	0,59	0,83	10,0	0,07	-	-	-	-	-	-
9	1,03	22,0	0,36	1,31	20,0	0,59	0,85	12,5	0,32	1,00	17,0	0,36	0,59	15,0	0,11	-	-	-	-	-	-
10	0,96	14,0	0,42	1,27	15,0	0,14	0,88	14,0	0,18	1,02	12,0	0,08	0,84	9,0	0,06	-	-	-	-	-	-
11	0,84	18,6	0,34	0,81	12,0	0,09	0,63	18,0	0,19	0,87	7,5	0,04	0,18	3,0	0,02	-	-	-	-	-	-
12	0,75	16,0	0,21	1,06	16,0	0,24	1,00	14,0	0,37	1,23	20,0	0,49	1,51	12,0	0,79	-	-	-	-	-	-
Média	0,94 ^A	18,22 ^d	0,30 ^{ac}	1,06 ^A	14,73 ^a	0,28 ^{ab}	0,96 ^A	16,54 ^{ad}	0,35 ^a	1,04 ^A	14,70 ^{ac}	0,28 ^{ab}	0,91 ^A	10,69 ^b	0,26 ^{ab}	0,54 ^B	9,50 ^{bc}	0,21 ^b	0,67 ^B	15,42 ^{abd}	0,19 ^{bc}
DP	0,26	3,45	0,14	0,16	2,99	0,18	0,16	2,86	0,16	0,15	4,23	0,17	0,37	4,89	0,24	0,02	0,71	0,06	0,22	5,32	0,12

Valores seguidos por uma mesma letra, entre os genótipos, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas, minúsculas e em minúsculo itálico fora utilizadas para comparações entre Peso da parte aérea, Comprimento da raiz e Peso da raiz, respectivamente.

Legenda: (-) = Evento que não foi possível realizar a fenotipagem; DP = Desvio Padrão; E.V= eventos; P. A. = Peso da parte aérea em grama; C. R. = comprimento da raiz em centímetro; P. R. = peso da raiz em grama.

4.3.5 Bioensaios com nematoides

A contagem de massa de ovos nas plantas de soja transformadas com o vetor vazio e o gene *GmHsp22.4* foram de 3,98 e 2,68 por grama de raiz respectivamente, enquanto, o valor encontrado no genótipo não transformada, NT, foi superior, sendo de 12,65. A contagem do número de galhas apresentou perfil semelhante em relação ao observado na contagem de massa de ovos, onde, o vetor vazio, o gene *GmHsp22.4*, NT DOKO RC apresentaram valores de 3,54, 2,78, e 10,85 por grama de raiz respectivamente (Tabela 3) (Figura 3S).

Embora as raízes de soja transformadas com *GmHsp22.4* tenham apresentado uma redução de 32% no número de massas e 21% de galhas por grama de raiz, quando comparado com o vetor vazio, o efeito foi variável e estatisticamente não significativo ao nível de 5% (Tabela 3).

Quanto ao FR (fator de reprodução), de modo similar, não houve diferença estatisticamente significativa, sendo obtidos os valores de 2,0 e 1,6 nas raízes transformadas com vetor vazio e com o gene de interesse, respectivamente. Quando os tratamentos transformados foram comparados com o controle, não-transformado, a diferença foi estatisticamente significativa, com o valor de 6,34 para o NT DOKO RC.

Contudo, ao analisar a quantificação da expressão do gene nas raízes de cada planta, pode-se observar uma elevada variação (Tabela 3); no entanto a normalização dos dados em função dos valores de expressão do gene alvo não alterou a significância entre as comparações realizadas (dados não apresentados).

Para o cálculo da contagem de fêmeas adultas em *A. thaliana*, foram utilizadas 12 plantas de cada um dos três eventos transformados com o Co-0:Vetor vazio G2D e com o gene de interesse Col-0:*GmHsp22.4*, no entanto em dois dos eventos testados restaram apenas 2 e 3 plantas, respectivamente devido a dificuldade no desenvolvimento das plantas (Tabela 5).

Ao contrário do esperado, o maior número de fêmeas adultas nas raízes de *A. thaliana* foi encontrado nas plantas transformadas, superexpressando o gene *GmHsp22.4*, sendo que o genótipo Col-0:*GmHsp22.4* evento 2, foi o mais evidente e estatisticamente significativo, com o valor de 625,76 fêmeas adultas por grama de raiz, ficando evidente que o gene *GmHsp22.4* não atua diretamente ou de modo independente na resistência ao nematoide *M. javanica* (Tabela 5).

O desvio padrão apresentou uma variação elevada, na qual o maior valor na contagem do número de fêmeas adultas foi no genótipo Col-0:*GmHsp22.4* evento 3, com um valor de 438,32, que pode ser atribuído ao baixo número de repetições que puderam ser utilizadas.

Tabela 5: Comparação da reprodução do nematoide *M. javanica* na raiz transgênica de *A. thaliana* Col-0:GmHsp22.4, Col-0:Vetor vazio G2D e não transformada (selvagem).

Amostras	Selvagem Col-0	Col-0: G2D Vetor Vazio 1	Col-0: G2D Vetor vazio 2	Col-0: G2D Vetor vazio 3	Col-0: GmHsp22.4 1	Col-0: GmHsp22.4 2	Col-0: GmHsp22.4 3
	N° de Fêmeas	N° de Fêmeas	N° de Fêmeas	N° de Fêmeas	N° de Fêmeas	N° de Fêmeas	N° de Fêmeas
1	133,33	481,48	116,67	291,95	108,13	418,18	33,33
2	108,94	60,92	141,11	288,89	223,33	833,33	126,19
3	239,39	179,71	58,90	171,30	366,67	-	1150,00
4	223,33	137,61	35,24	197,98	69,28	-	31,25
5	165,59	262,22	287,50	188,51	321,21	-	312,12
6	77,58	191,67	58,64	122,22	132,05	-	42,59
7	330,56	112,40	204,90	325,93	53,33	-	-
8	84,13	196,67	124,11	86,44	552,38	-	-
9	100,93	71,75	56,25	164,81	166,67	-	-
10	75,40	250,00	88,89	300,00	572,22	-	-
11	38,24	218,52	108,77	633,33	200,00	-	-
12	168,25	127,78	175,68	53,06	48,10	-	-
Média	145,47^a	190,89^a	121,39^a	235,37^a	243,76^a	625,76^b	330,58^a
DP	84,38	112,01	73,02	153,06	182,74	293,56	438,32

Valores seguidos por uma mesma letra, entre os genótipos, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

*Valores por g de raiz.

Legenda: (-) = Amostras que não foi possível realizar a fenotipagem; DP = Desvio Padrão.

4.4 DISCUSSÃO

Os genes de choque térmico têm como principal função atuarem como chaperonas moleculares, sendo descritos em inúmeros estudos como envolvidos na resistência a diversos estresses bióticos e abióticos (FREITAS et al., 2012). Em estudo prévio, o gene *GmHsp22.4* foi identificado como potencialmente envolvido na resposta de resistência à infecção pelo nematoide *M. javanica* (LOPES-CAITAR et al., 2013), sendo este um patógeno de grande interesse por causar diversos prejuízos à produção de soja. Os níveis de expressão foram significativamente induzidos apenas nos genótipos resistentes após a infecção com o patógeno.

Com intuito de verificar possíveis diferenças entre a proteína expressa, a análise comparativa da sequência da região codificadora dos genótipos resistente e suscetível ao patógeno comprovou que as sequências são idênticas, indicando que a resposta ao nematoide poderia estar relacionada apenas em função do nível regulacional, baseado na alteração dos níveis de expressão do gene na presença do estresse.

Com base no resultado, a diferença entre o genótipo resistente e suscetível poderia estar relacionado também com a alteração no promotor, como descreve Escobar et.al. (2003). Além disso, na variação epigenética como metilação, modificação da histona e RNAs não codificante (DHAR, et.al., 2014).

A superexpressão deste gene, portanto, visaria comprovar tal hipótese, auxiliando na compreensão do envolvimento destas chaperonas na resistência a esse patógeno. De acordo com os resultados, a superexpressão do *GmHsp22.4* em raízes de soja quimérica, assim como em *A. thaliana* superexpressando constitutivamente o gene, não apresentou resultados significativos, de resistência ou tolerância, em resposta à infecção pelo nematoide de galha, quando comparado com as plantas transformadas com o vetor vazio.

Ainda, por meio da identificação do gene ortólogo do *GmHsp22.4* em *A. thaliana*, observou-se uma alta similaridade com o *At4g10250*, logo a superexpressão seria de uma proteína com função potencialmente similar ao gene endógeno da planta, funcionando como chaperona molecular e auxiliando na resistência ao nematoide. Entretanto ao superexpressar o gene *GmHsp22.4* em *Arabidopsis* não pode verificar essa resposta.

Lopes-Caitar et al. (2013) identificaram outros seis genes, membros da família *Hsp20*, diferentemente responsivos à infecção por *M. javanica* entre os genótipos resistente e suscetível. Uma das possíveis hipóteses para não se observar efeito da superexpressão do gene *GmHsp22.4* seria que a resistência mediada por proteínas chaperonas poderiam ser uma característica quantitativa, que envolveria a ação de outras das HSP20 identificadas. O envolvimento deste gene na resposta à infecção com o patógeno foi confirmado novamente neste trabalho, uma vez que os níveis de expressão do gene *GmHsp22.4* foram significativamente induzidos nas plantas transformadas após 54 dpi em relação ao transformado com o vetor vazio. Sendo assim, embora este gene sozinho não seja capaz de promover a resistência à infecção ao nematoide, ele parece ter um importante papel nesta resposta, sugerindo que outros genes Hsp20, tais como: *GmHsp 17.6B*, *17.9B*, *16.2B*, *22.3B* possam trabalhar em conjunto para conferir a resistência.

Apesar de vários trabalhos apresentarem resultados significativos de incrementos na resistência à nematoides após a expressão de apenas um único gene (ESCOBAR et al., 2003), o efeito aditivo conferido por poligenes tem sido frequentemente relacionado a resistência à nematoides, ou seja, um único gene não é suficiente para promover a resistência, mas sim a ação integrada do produto de expressão de um conjunto de genes. Além disso, o número de cópias de um gene ou bloco de genes também podem influenciar o fenótipo final. Cook et al. (2012) caracterizaram a região contendo o gene *Rgh1* que confere resistência ao nematoide de cisto *Heterodera glycines*. A caracterização física da região contendo o gene *Rgh1* revelou a presença de três genes *Glyma 18g02580*, *Glyma 18g02590* e *Glyma 18g02610* constituindo um bloco de 31-kb, que se repetia em pelo menos sete a 10 cópias apenas nos genótipos resistentes. O nível de expressão destes genes era significativamente superior nos genótipos com maior número de repetições e, conseqüentemente, apresentavam maiores níveis de resistências.

Adicionalmente, Melito et al. (2010), caracterizou o gene *LRR-K* (receptor-quinase de transmembrana com repetições ricas em leucina) presente no *locus Rhg 1* na resistência ao nematoide de cisto. Após o ensaio demográfico do nematoide, observou-se uma diferença significativa entre os genótipos resistente e suscetível, entretanto quando o gene *LRR-K* foi introduzido no *locus Rhg 1*, em planta suscetível que carregava o *locus Rhg4⁺* (fonte de resistência), não houve incrementos significativos na resistência ao nematoide.

De modo similar, o silenciamento do gene *LRR-K*, utilizando o *miRNA* para reduzir a expressão no genótipo resistente (PI 88788), também não foi possível detectar alteração na resistência ao nematoide de cisto, sugerindo novamente que um ou mais genes presentes no *locus Rhg 1* poderiam ser o determinante primário da diferença na resistência ao nematoide de cisto.

A expressão dos genes *Hsp20* é regulada a nível transcricional pelos HSF (*Heat Shock Factor*). Esses fatores de transcrição são responsáveis pela a ativação das *Hsps*, incluindo as *Hsp20*, principalmente sob estresse de calor, mas esses também podem estar relacionados à resposta da planta a outros estresses. Lopes-Caitar (2013) definiu uma provável estrutura organizacional mínima da região promotora que difere entre *Hsp20* responsivas a diferentes estresses. Esses dados indicam uma provável co-expressão de diferentes *Hsp20* reguladas por um ou diferentes HSFs, baseado em sua estrutura de promotor. Além disso, esse único fator de transcrição poderia ser ativado somente quando houver uma rede de sinalização complexa de HSF, na qual um fator de transcrição é responsável para ativar o gene, mais também pela ativação de outros fatores de transcrição relacionados com o estresse (NISHIZAWA-YOKOI et al., 2011).

Desse modo, a caracterização da região promotora do gene *GmHsp22.4* seria importante para definir potenciais elementos característicos de *Hsp20* responsivas a *M. javanica*, bem como identificar demais chaperonas potencialmente co-expressas responsáveis pela alteração nos níveis de resistência. Escobar et al. (2003), em seu trabalho de caracterização da região promotora do gene *HsHsp17.4* em *Tabaco*, identificou regiões reguladoras na qual se ligavam os fatores de transcrição de choque térmico, observando uma acentuada diminuição da resposta à infecção por nematoide quando domínios específicos eram mutados.

A rede de regulação mediada por HSF pode ser ainda mais complexa e envolvida na resposta a diferentes patógenos. De acordo com KUMAR et al., (2009), os fatores HSF de *A. thaliana* poderiam atuar na regulação negativa de genes, como por exemplo, do gene *Pdf1.2*, que estão ligadas nas resposta imune, sendo neste trabalho envolvido na resistência ao fungo *Alternaria brassicicola*. A resistência ao patógeno foi conferida apenas quando ocorreu uma mutação no HsfB2b, e, ainda, os autores citam a hipótese desse fator estar interagindo com outro fator de transcrição para exercer a repressão do gene alvo.

Outra possibilidade de se não observar a resistência ao nematoide seria que os altos níveis de expressão do gene *GmHsp22.4* sob regulação do promotor 35S pode estar levando a um elevado custo energético para as plantas em detrimento da sua capacidade responder ao patógeno. Isto pode ser evidenciado em dois dos três eventos de *A. thaliana* testados, em que a superexpressão teve efeito direto na morfologia e desenvolvimento das plantas, e pelo menos um dos eventos se mostrou estatisticamente mais suscetível ao patógeno quando comparados com os demais controles.

Alternativamente a indução constitutiva do gene *GmHsp22.4* poderia estar alterando a transcrição de outros genes essenciais na resistência, ou até mesmo no desenvolvimento da planta, já que o genótipo Col-0: *GmHsp22.4* apresentou maior dificuldade de crescimento em relação aos outros genótipos.

Desta forma, o alto nível de *GmHsp22.4*, poderia ter levado ao efeito antagonista em outros genes que estão relacionados também com a resposta à infecção pelo nematoide, como observou Song et al. (2014) o efeito antagônico entre os fatores de transcrição MYC2 (ativador do JA-ácido jasmonato) e EIN3/EIL1 (estabilizador do ET-etileno). O primeiro apresenta como função de regular o desenvolvimento e defesa da planta, já o segundo está relacionado com a formação de gancho apical.

O autor observou que a interação do fator de transcrição MYC2 com o EIN3/EIL1 reprimia a ativação do EIN3/EIL1 em *A. thaliana* e conseqüentemente a inibição da formação de gancho apical, regulado por ET. Igualmente essa interação levou a uma diminuição da expressão de genes responsáveis a lesão, induzido pelo ácido jasmonato (JA). Baseado no exposto, uma das formas mais diretas de se evidenciar o efeito do gene *GmHsp22.4* na resposta de resistência a nematoides poderia ser o emprego de estratégias de silenciamento gênico.

Tal efeito pode ainda ser explicado devido ao efeito de inserção do transgene no genoma de *A. thaliana*, afetando algum gene essencial, logo para maior esclarecimento, um maior número de eventos positivos serão avaliados.

Alternativamente, ressalta-se ainda que embora modificações no protocolo de transformação tenham permitido uma boa recuperação das plantas compostas de soja, permitindo a condução dos bioensaios com nematoides, o elevado tempo exigido para avaliação das plantas, em torno de 50 a 60 dias, causou um estresse elevado às plantas, o que pode ter interferido nos resultados. No entanto, resultados

similares foram obtidos quando o mesmo gene foi superexpresso constitutivamente em plantas de *A. thaliana*, demonstrando que muitas das hipóteses apresentadas merecem ser testadas.

4.5 CONCLUSÕES

Ao analisar a sequência da região codante dos genótipos resistente e suscetível de soja, não foi observado nenhum polimorfismo entre elas. Ainda, a superexpressão transiente do gene *GmHsp22.4* em raízes de soja não levou à alteração do fenótipo em resposta ao nematoide.

De modo similar, a expressão constitutiva do gene em *A. thaliana* também não conferiu à resistência ao patógeno, no entanto levou a redução do peso da raiz, em relação a selvagem, e apresentou retardo no desenvolvimento das plantas.

Com base nesses resultados, concluiu-se que a superexpressão do gene não seria uma estratégia eficiente na promoção da resistência ao nematoide, indicando que o envolvimento das *Hsp20* na resposta de resistência a *M. javanica* poderia estar ocorrendo apenas quando houvesse a atuação de um conjunto de *Hsp20* e/ou outros genes, bem como na variação do número de cópias, assim como a influência de um ou mais fator de transcrição na expressão do gene.

4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalho futuros visando à caracterização de outros seis genes que codificam Hsp20, previamente identificados por Lopes-Caitar et al. (2013), bem como de fatores de transcrição capazes de regular esses genes, ou o silenciamento do gene *GmHsp22.4*, contribuirão para elucidação do papel destas chaperonas na resistência a este nematoide.

REFERÊNCIAS

- ADI, M. et al. Stress Responses to Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) Infection of Resistant and Susceptible Tomato Plants are Different. **Metabolomics: Open Access**, n. 1, p. 1–13, 2012.
- ALMEIDA, Á. M. R.; SEIXAS, C. D. S. **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. 1. ed. [s.l.] Embrapa, 2010. p. 399
- ALVES, T. C. U. et al. REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA AO NEMATÓIDE DAS LESÕES RADICULARES *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Biodiversidade**, v. 10, n. 1, p. 73–79, 2011.
- AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University - Science**, v. 23, n. 2, p. 139–150, abr. 2011.
- ANDRADE, E. R. DE. **Caracterização e Comparação da Linhagem de Soja UnB 1125 de Tegumento Preto com Genótipos Comerciais**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2012.
- APROSOJA, A. **Nematoides e ferrugem asiática são maiores causadores de perdas para a soja - Agricultura | RuralBR**. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2011/10/nematoides-e-ferrugem-asiatica-sao-maiores-causadores-de-perdas-para-a-soja-3506686.html>>. Acesso em: 6 nov. 2014.
- ASMUS, G.; ANDRADE, P. Níveis de danos do nematóide de cisto da soja. **Embrapa Agropecuária Oeste**. ..., n. 1, p. 1–4, 2002.
- BARCALA, M. et al. Distinct heat-shock element arrangements that mediate the heat shock, but not the late-embryogenesis induction of small heat-shock proteins, correlate with promoter activation in root-knot nematode feeding cells. **Plant molecular biology**, v. 66, n. 1-2, p. 151–64, jan. 2008.
- BENTEM, S. DE LA F. VAN et al. Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 43, n. 2, p. 284–98, jul. 2005.
- BHATTARAI, K. K. et al. The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. **Plant physiology**, v. 144, n. 1, p. 312–23, maio 2007.
- BONATO, E. Estresses em soja. **Embrapa Trigo**, p. 254, 2000.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. **EMBRAPA-CNPSO. Documentos**, v. 21, p. 61, 1987.

BONDINO, H. G.; VALLE, E. M.; TEN HAVE, A. Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/ α -crystallin family in higher plants. **Planta**, v. 235, p. 1299–1313, 2012.

CASPERS, G. J.; LEUNISSEN, J. A; DE JONG, W. W. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved “alpha-crystallin domain”. **Journal of molecular evolution**, v. 40, n. 3, p. 238–48, mar. 1995.

CONAB. Quarto levantamento-2014/15. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**, v. 2, n. 4, p. 1–90, 2015.

COOK, D. E. et al. Copy number variation of multiple genes at Rhg1 mediates nematode resistance in soybean. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6111, p. 1206–9, 30 nov. 2012.

CURTIS, R. H. C. et al. The Arabidopsis F-box/Kelch repeat protein At2g44130 is up-regulated in giant-cells and promotes nematode susceptibility. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, India, 04 oct. 2012. p. 8.

DHAR, M. K. et al. Epigenetic Dynamics : Role of Epimarks and Underlying Machinery in Plants Exposed to Abiotic Stress. **International Journal of Genomics**, India, 07 aug. 2014. p. 11.

DONG, Y. S. et al. The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 108, n. 5, p. 931–6, mar. 2004.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de Produção de Soja- Região Central do Brasil 2014**. 1°. ed. Londrina: [s.n.]. p. 268

ESCOBAR, C. et al. Induction of the Hahsp17.7G4 promoter by root-knot nematodes: involvement of heat-shock elements in promoter activity in giant cells. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 16, n. 12, p. 1062–8, dez. 2003.

FERRAZ, L. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. ... **meloidoginoses da soja**. Londrina, **EMBRAPA–Soja**, 2001.

FRANZENER, G. et al. Nematóide Formadores de Galha e de Cisto Patogênicos à Cultura da Soja em Municípios do Oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 261–265, 2005.

FREITAS, W. E. DE S. et al. Ação das Proteínas de Choque Térmico em frutos. **ACSA-Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 8, n. 4, p. 01–06, 2012.

FUGANTI, R. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 125–130, 2004.

- FUGANTI, R. et al. Size of AT(n) insertions in promoter region modulates Gmhsp17.6-L mRNA transcript levels. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 847673, jan. 2010.
- HARRISON, S. J et al. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. **Plant methods**, Cambridge, 06 nov. 2006. p.4.
- HASLBECK, M. Cellular and Molecular Life Sciences sHsps and their role in the chaperone network. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1649–1657, 2002.
- HEIN, I.; BARCISZEWSKA-PACAK, M. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. **Plant Physiology**, v. 138, n. August, p. 2155–2164, 2005.
- HYMOWITZ, T.; NEWELL, C. A. Taxonomy of the Genus *Glycine*, Domestication and Uses of Soybeans. **Economic Botany**, v. 35, n. August 1980, p. 272–288, 1981.
- JONG, W. W. DE; LEUNISSEN, J. A; VOORTER, C. E. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 1, p. 103–26, jan. 1993.
- KANDOTH, P.; ITHAL, N.; RECKNOR, J. The soybean *Rhg1 locus* for resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* regulates the expression of a large number of stress-and defense-related. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1960–75, abr. 2011.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in plant science**, v. 7, n. 5, p. 193–5, maio 2002.
- KOTAK, S. et al. Complexity of the heat stress response in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 3, p. 310–6, jun. 2007.
- KUMA, K. M. **Otimização do Método de Transformação de Raízes de Soja por *Agrobacterium rhizogenes* e identificação de genes normalizadores para estudos por RT-qPCR em resposta à infecção por nematoides**. 2014. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.
- KUMAR, M. et al. Heat shock factors HsfB1 and HsfB2b are involved in the regulation of Pdf1.2 expression and pathogen resistance in *Arabidopsis*. **Molecular plant**, v. 2, n. 1, p. 152–65, jan. 2009.
- LEE, G. J. et al. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. **The EMBO journal**, v. 16, n. 3, p. 659–71, 3 fev. 1997.

LI, J.; TODD, T. C.; TRICK, H. N. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. **Plant cell reports**, v. 29, n. 2, p. 113–23, fev. 2010.

LI, S. et al. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. **ISRN Industrial Engineering**, v. 2013, 2013.

LIBEREK, K.; LEWANDOWSKA, A.; ZIETKIEWICZ, S. Chaperones in control of protein disaggregation. **The EMBO journal**, v. 27, n. 2, p. 328–35, 23 jan. 2008.

LIU, K. **Soybeans : Chemistry, Technology, and Utilization**. [s.l.] Aspen Publisher, 1997. p. 532

LIU, Z. et al. Molecular cloning and characterization of Hsp27.6: the first reported small heat shock protein from *Apis cerana cerana*. **Cell stress & chaperones**, v. 17, n. 5, p. 539–51, set. 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOPES, M. J. C. **Aspectos Histopatológicos e Mudanças na Expressão de Genes Meloidogyne javanica**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2009.

LOPES-CAITAR, V. S. et al. Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 577, 28 ago. 2013.

LU, R. et al. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 21, p. 5690–9, 3 nov. 2003.

MAPA. **Soja**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 16 out. 2013.

MELITO, S. et al. A nematode demographics assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the *Rhg1 locus* LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance. **BMC plant biology**, v. 10, p. 104, jan. 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, 1962.

NISHIZAWA-YOKOI, A. et al. HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response to environmental stress. **Plant & cell physiology**, v. 52, n. 5, p. 933–45, maio 2011.

NOGUEIRA, A. P. O. **Análise Discriminante na Caracterização de Novos Descritores em Soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2007.

RIBEIRO, N.; DIAS, W.; SANTOS, J. Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja do estado de Mato Grosso. **Rondonópolis: Fundação MT**, 2010.

SCOFIELD, S. R. et al. Development of a Virus-Induced Gene-Silencing System for Hexaploid Wheat and Its Use in Functional Analysis of the Lr21 -Mediated Leaf Rust Resistance Pathway. **Plant Pathology**, v. 138, n. August, p. 2165–2173, 2005.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. 1. ed. [s.l.] Mecenas, 2009. p. 314

SHIRASU, K.; SCHULZE-LEFERT, P. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. **Trends in plant science**, v. 8, n. 6, p. 252–8, jun. 2003.

SILVA, J.F.V. et al. Produção de grãos em ambientes com nematoides de galhas. **Documentos Embrapa**, p. 15, 2001.

SONG, S. et al. Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 26, n. January, p. 263–79, 2014.

TAYLOR, A. .; SASSER, J. . **Biology identification and control of root-knot nematodes**. U.S.A. p. 110

VAN OOIJEN, G. et al. The small heat shock protein 20 RSI2 interacts with and is required for stability and function of tomato resistance protein I-2. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 63, n. 4, p. 563–72, ago. 2010.

VIERLING, E. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 579–620, jun. 1991.

VUONG, T.; JIAO, Y. Nematode Resistance in Soybean. ... **Genomics for Crop ...**, v. 1, n. Wilson 2004, p. 95–124, 2013.

WANG, G.-F. et al. Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. **The New phytologist**, v. 191, n. 2, p. 418–31, jul. 2011.

WATERS, E. R. The Molecular Evolution of the Small Heat-Shock Proteins in Plants. **Genetics**, v. 141, p. 785–95, 1995.

XU, Y.; ZHAN, C.; HUANG, B. Heat shock proteins in association with heat tolerance in grasses. **International journal of proteomics**, v. 2011, p. 529648, jan. 2011.

XU, Z.-S. et al. Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 15706–23, jan. 2012.

ZHANG, Y. et al. sHsp22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defence and development in *Apis cerana cerana*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 53, p. 1–12, out. 2014.

DADOS SUPLEMENTARES

Figura 1S: Mergulho dos botões florais na solução de infiltração.



Figura 2S: Plantas de *A. thaliana* após a inoculação. (A) coberta com plástico após o mergulho na solução de infiltração para manter a umidade. (B) Isolamento dos vasos vizinhos com as sílicas já castanhas por meio de um filme plástico.

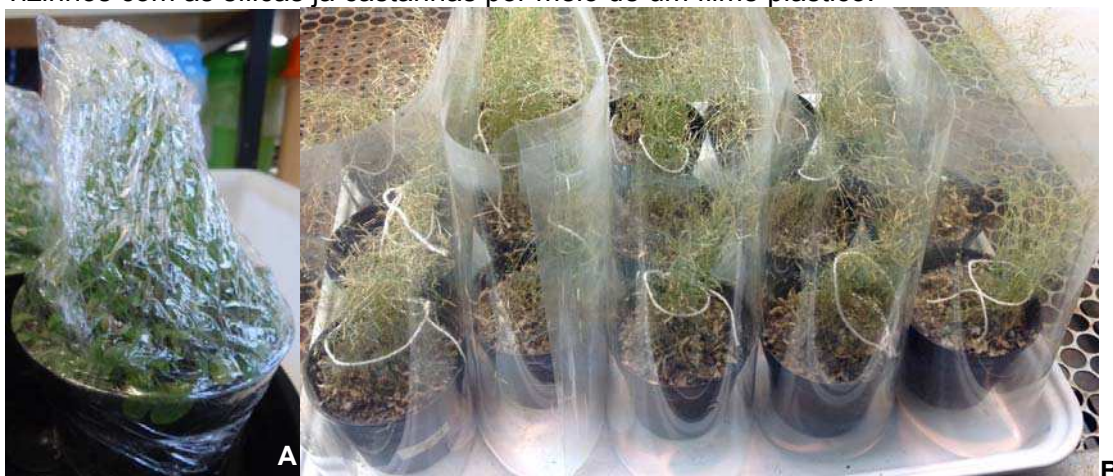


Figura3S: Imagem mostrando as galhas formadas por *M.javanica* nas raízes de soja controle e transformada com o gene *GmHsp22.4*. (A) Raízes do genótipo PI 595099 após sete semanas da inoculação do nematoide. Pode se observar várias massas de ovos (esfera vermelha) e galhas (raízes mais grossas). (B) Raízes do genótipo Doko RC transformado com gene *GmHsp22.4* após 7 semanas da inoculação do nematoide. Observa-se a formação de galhas e massas de ovos em menor intensidade ao genótipo PI 595099.

