



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KÁTIA MIKI KUMA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE GERAÇÃO DE PLANTAS
COMPOSTAS DE SOJA E VALIDAÇÃO DE
NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO
GENICA POR RT-QPCR EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR
*Meloidogynes javanica***

Londrina
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Soja

KÁTIA MIKI KUMA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE GERAÇÃO DE PLANTAS
COMPOSTAS DE SOJA E VALIDAÇÃO DE
NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO
GENICA POR RT-QPCR EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR
*Meloidogynes javanica***

Londrina
2014

KÁTIA MIKI KUMA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE GERAÇÃO DE PLANTAS
COMPOSTAS DE SOJA E VALIDAÇÃO DE
NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO
GENICA POR RT-QPCR EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR
*Meloidogynes javanica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, PR.

Orientadora: Dra. Francismar Corrêa Marcelino
Guimarães

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K96o Kuma, Kátia Miki.

Otimização do método de geração de plantas compostas de soja e validação de normalizadores para estudos de expressão genica por RT-qPCR em resposta a infecção por *Meloidogynes javanica* / Kátia Miki Kuma. – Londrina, 2014.
94 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, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. Genes – Teses. 3. Soja – Cultivo – Teses. 4. Genética vegetal – Teses. 5. *Meloidogynes javanica* – Teses. 6. Alimentos – Biotecnologia – 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

KÁTIA MIKI KUMA

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE GERAÇÃO DE PLANTAS
COMPOSTAS DE SOJA E VALIDAÇÃO DE NORMALIZADORES
PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GENICA POR RT-QPCR EM
RESPOSTA A INFECÇÃO POR *Meloidogynes javanica***

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

Dra. Francismar C. Marcelino Guimarães
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Renata Stolf Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Mayra C. da C. Gallo de Carvalho
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Londrina, 11 de Dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e à Coordenação de Pós-graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pela minha formação acadêmica.

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, pela orientação no trabalho, paciência, ensinamentos, críticas e pelo exemplo profissional, contribuindo muito para o meu crescimento pessoal e profissional;

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

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, por sempre me ajudarem: Suellen Hishinuma, Alessandra Yokoyama, Talita Parmezan, Adriana Polizel, Cynara Romero, Idenize Orsini, João Vitor Maldonado, Juliane Marinho, Juliana Marcolino, Luana Darben, Luciano Aoyagi, Mayla Molinari, Michelle Rincão, e todos os outros que tanto colaboraram.

À Valeria Caitar, que tanto me ajudou no entendimento do meu trabalho quanto na condução dos experimentos, pela dedicação e amizade.

Ao meu marido, Giovano Aparecido de Lima, pelo apoio, paciência, dedicação e companheirismo;

Meus pais e irmã pelo apoio e dedicação.

E a todos que contribuíram e possibilitaram a realização deste trabalho.

KUMA, Kátia Miki. **Otimização do método de geração de plantas compostas de soja e validação de normalizadores para estudos de expressão genica por RT-qPCR em resposta a infecção por *Meloidogynes javanica***. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

RESUMO

Os métodos aplicados à análise funcional de genes são de fundamental importância na validação de resultados obtidos de estudos *in silico* e/ou de prospecção gênica. Os métodos de transformação genética para a obtenção de tecidos com expressão transiente e de rápidos resultados são os de maior interesse. Dessa forma, a transformação via *A. rhizogenes* torna-se um método rápido para a obtenção de plantas contendo raízes transformadas, além de se mostrar eficiente em estudos de superexpressão e/ou silenciamento de genes relacionados a estresses causados por fitopatógenos de raízes. Alguns protocolos têm sido adaptados em soja, mas há limitações na eficiência de transformação, levando a um reduzido número de plantas em bom estado para a condução de bioensaios. Neste trabalho, o método de transformação de raízes de soja com *A. rhizogenes* foi otimizado permitindo uma elevação significativa na eficiência na transformação e recuperação de plantas transformadas, visando sua aplicação em estudos envolvendo a interação da soja com nematoides. Após a adição de uma etapa de recuperação via hidroponia e alteração no processo de seleção com a retirada do antibiótico higromicina, foi obtida uma taxa de 55% de eficiência de transformação. As análises de RNAm conduzidas via RT-qPCR são amplamente utilizadas para a validação do perfil de expressão gênica, uma vez que constitui uma metodologia muito sensível, específica, rápida e com boa reprodutibilidade. Tais análises necessitam do emprego de genes normalizadores, cujo níveis de expressão permaneçam invariáveis entre os diferentes órgãos, estágios de desenvolvimento e tratamento em estudo. Desse modo, tais normalizadores são indispensáveis à precisão da quantificação da expressão gênica, eliminando variações devido à quantidade inicial de cDNA adicionado nas reações, garantindo que apenas as variações na expressão dos genes sejam consideradas. Neste trabalho sete genes comumente utilizados como normalizadores em ensaios de RT-qPCR (*GmELF1- α* , *GmELF1- β* , *GmTUA*, *GmTUB*, *Gm β -actina*, *GmGAPDH* e o *GmRNAr18S*) foram avaliados quando à estabilidade de expressão em raízes transformadas via *A. rhizogenes*, submetidas à infecção com *M. javanica*, nos períodos de inoculação de 8 e 50 dpi (dias após inoculação), a fim de identificar os melhores normalizadores sob tais condições. Os genes *GmELF1- β* e *GmELF1- α* foram os mais estáveis em todas as análises comparativas enquanto o gene *GmGAPDH* foi o que apresentou menor estabilidade.

Palavras-chave: Transformação transiente. Raízes transgênicas. Plantas compostas de soja. Genes de referencia.

KUMA, Katia Miki. **Optimization method of generating composite plants of soybean and validation housekeeping for studies of gene expression by RT-qPCR in response to *Meloidogynes javanica* infection.** 2014. 94 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina - PR.

ABSTRACT

Applied methods to functional analysis of genes are critical for validation of results obtained from in silico studies and/or by gene prospecting. Methods of genetic transformation to obtain transient expression tissues and rapid results are the major interest. Thus, the transformation through *A. rhizogenes* becomes an extremely fast method for obtaining transgenic roots; in addition it is efficient to overexpression genes related to stresses caused by root's phytopathogens. Some protocols have been adapted, but there are limitations on the transformation efficiency, causing a reduction on the amount of plants in good condition obtained for conducting bioassays with nematodes. In this work the method of transformation of soybean roots with *A. rhizogenes* was optimized allowing a significant increase in efficiency in the processing and recovery of transformed plants, for their application in studies involving the interaction of soybean and nematodes. After addition of a recovery step by hydroponic and changing the selection process with the exclusion of hygromycin antibiotic a rate of 55% transformation efficiency was obtained. The mRNA analyzes conducted by RT-qPCR are widely used for the validation profile of gene expression, since it is a very sensitive, specific, fast and with good reproducibility method. These analyzes require the use of housekeeping genes whose expression levels remain unchanged between the different organs, developmental stages and study treatment. Thus, normalizing is essential to the accuracy of quantification expression gene, eliminating variation due to the initial amount of cDNA added to the reaction, ensuring that only changes in gene expression are considered. In this work seven genes commonly used as a housekeeping gene in RT-qPCR assays (GmELF1- α , β -GmELF1, GmTUA, GmTUB, Gm β -actin, and GmGAPDH GmRNAr18S) were evaluated the stability of expression in transformed and untransformed roots via *A. rhizogenes*, subject to infection with *Meloidogyne javanica*, during periods of inoculation 8 and 50 dpi (days after inoculation) in order to identify the best normalizing genes under such conditions. The GmELF1- β and GmELF1 - α genes were the most stable in all benchmarks, while the GmGAPDH gene showed the lowest stability.

Key-words: Transient transformation. Transgenic roots. Composite plants of soybean. Housekeeping gene.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	9
1.1	INTRODUÇÃO GERAL	9
1.2	OBJETIVO GERAL	11
1.2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
1.3	REVISÃO DE LITERATURA	12
1.3.1	A SOJA E O AGRONEGÓCIO BRASILEIRO	12
1.3.2	OS NEMATOIDES E A CULTURA DE SOJA	13
1.3.3	NEMATOIDES DE GALHA	15
1.3.4	EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES PARA ESTUDO DA FUNÇÃO GÊNICA	19
1.3.5	TRANSFORMAÇÃO VIA <i>AGROBACTERIUM RHIZOGENES</i>	21
1.3.6	ANÁLISE POR RT-QPCR E IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO DOS GENES NORMALIZADORES	26
	REFERÊNCIA	33
2	CAPITULO 2 – ARTIGO 1: OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA POR <i>Agrobacterium rhizogenes</i> PARA BIOENSAIOS COM NEMATOIDES	40
	RESUMO	40
	ABSTRACT	41
2.1	INTRODUÇÃO	42
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.2.1	MATERIAL BIOLÓGICO	44
2.2.2	TRANSFORMAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM RHIZOGENES</i>	45
2.2.3	TRANSFORMAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA POR <i>AGROBACTERIUM RHIZOGENES</i>	45
2.2.4	SELEÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS	46
2.2.5	ACLIMATAÇÃO VIA HIDROPONIA	47
2.2.6	EFEITO DA HIGROMICINA NAS PLANTAS TRANSFORMADAS	48
2.2.7	CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DAS RAÍZES	49
2.2.8	CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>EGFP</i> NAS RAÍZES	50
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
2.3.1	EFICIÊNCIA NA RECUPERAÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS	52
2.3.2	SELEÇÃO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS VIA OBSERVAÇÃO DO <i>EGFP</i>	54

2.3.3	ETAPA DE ACLIMATAÇÃO – HIDROPONIA.....	55
2.3.4	CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DAS RAÍZES	57
2.3.5	INFLUÊNCIA DA HIGROMICINA NA SELEÇÃO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS	58
2.3.6	COMPARAÇÃO ENTRE RAÍZES TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS	60
2.1.3.6	EXPRESSÃO DE EGFP NAS RAÍZES.....	61
2.4	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
3	CAPITULO 3 - ARTIGO 2: VALIDAÇÃO DE NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR EM PLANTAS COMPOSTAS DE SOJA EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR <i>Meloidogyne javanica</i>.....	66
	RESUMO.....	66
	ABSTRACT.....	67
3.1	INTRODUÇÃO.....	68
3.2	MATERIAL E MÉTODO	70
3.2.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	70
3.2.2	CONSTRUÇÃO DOS CASSETES E TRANSFORMAÇÃO DA <i>AGROBACTERIUM RHIZOGENES</i>	70
3.2.3	PRODUÇÃO DE PLANTAS COMPOSTAS.....	72
3.2.4	CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO.....	73
3.2.5	OBTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DE <i>MELOIDOGYNE JAVANICA</i>	74
3.2.6	BIOENSAIOS COM <i>MELOIDOGYNE JAVANICA</i> EM SOJA	75
3.2.7	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	75
3.2.8	ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO – RT-QPCR	76
3.2.9	CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO PELO PATÓGENO.....	79
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.3.1	CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DA <i>AGROBACTERIUM RHIZOGENES</i>	80
3.3.2	CONFIRMAÇÃO DAS PLANTAS COMPOSTAS	81
3.3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES NORMALIZADORES.....	84
3.4	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91

1. CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja foi introduzida no Brasil em 1882, no estado da Bahia, mas a produção em escala comercial ocorreu apenas em meados de 1950, e desde então a produção e produtividade aumenta gradativamente. Esse crescimento deve-se ao empenho de institutos de pesquisa, do Brasil e do mundo, que têm gerado tecnologias capazes de superar, a cada ano, os desafios que a cultura enfrenta.

Pesquisas relacionadas ao melhoramento do cultivo são uma das principais responsáveis pelo crescimento da produção desta “commodity”. A busca por genes relacionados ao aumento de produtividade, ao desenvolvimento rápido e com qualidade, e à melhor adaptação aos mais variados tipos de ambientes e estresses, sejam esses bióticos ou abióticos, tem sido o maior foco de tais pesquisas. Assim, desenvolver e aprimorar métodos que auxiliem na identificação desses genes é de fundamental importância para a ciência e, conseqüentemente, para a agricultura.

Com a revolução nas técnicas de sequenciamento em larga escala, a quantidade de genomas e dados de transcriptoma disponíveis se eleva rapidamente. A validação funcional ou genômica funcional se caracteriza como uma etapa crucial para desvendar a função de genes e na compreensão das redes gênicas ativadas e/ou reprimidas em respostas aos mais variados tipos de fatores.

Os métodos de transformação gênica para a obtenção de tecidos com expressão transiente, capazes de gerar resultados rápidos são os de maior interesse. A transformação transiente de raízes de soja via *A. rhizogenes* é um método atrativo para a obtenção de plantas compostas (plantas que possuem somente as raízes adventícias transformadas e o restante da planta não é transformada), que permite o estudo da função de genes relacionados a estresses causados por fitopatógenos de raízes em larga escala.

A técnica de PCR em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR) é uma das principais técnicas utilizadas na validação da função local (poucos genes quando comparado à análise global) de genes via seu perfil de expressão, devido a sua alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na quantificação.

Porém, vários fatores como: a variação da quantidade e integridade do RNA, a eficiência da síntese de cDNA (Transcrição reversa) e da PCR, podem interferir

nos resultados de quantificação. Para minimizar variações devido a quantidade inicial de cDNA adicionada nas diferentes amostras, que podem levar a sub ou superestimativas nos níveis de expressão de um determinado gene alvo, os ensaios de quantificação relativa da expressão gênica utilizam genes normalizadores. Tais genes devem apresentar expressão constante em todos os tipos de tecidos e células e na condição de estudo. No entanto, como os níveis de expressão variam conforme o tecido, o estágio de desenvolvimento e diferentes condições experimentais, a identificação dos genes normalizadores se faz necessária de acordo com as condições de estudo.

Este trabalho teve como objetivo a otimização do método de transformação de raízes de soja via *Agrobacterium rhizogenes*, para a produção de plantas compostas, visando o estudo funcional de genes em raízes de soja, bem como a validação de genes normalizadores para utilização nas análises de quantificação relativa via RT-qPCR de genes nessas raízes em experimentos de inoculação com o nematoide *Meloidogyne javanica*.

1.2. OBJETIVO GERAL

Aperfeiçoar a metodologia de transformação de raízes por *Agrobacterium rhizogenes* em soja, visando obter maior eficiência de transformação e recuperação de plantas compostas, e identificar genes normalizadores para estudos de expressão gênica, por RT-qPCR, utilizando as raízes transformadas em bioensaios com nematoides.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estipular o melhor tempo de germinação das sementes de soja para a transformação;
- ✓ Estabelecer a melhor condição de seleção das raízes transformadas, sem a utilização do antibiótico higromicina na etapa de seleção das raízes;
- ✓ Estabelecer a hidroponia como etapa de aclimatação das raízes transgênicas, após a etapa de seleção;
- ✓ Selecionar os genes normalizadores mais estáveis para serem utilizados em análises de expressão gênica quantitativa via RT-qPCR, a partir de amostras oriundas de bioensaios com o nematoide *Meloidogyne javanica*, utilizando as raízes transformadas com *A. rhizogenes*.

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1. A SOJA E O AGRONEGÓCIO BRASILEIRO

A soja originou-se na costa leste da Ásia há mais de cinco mil anos e é muito utilizada como alimento no oriente. No ocidente, o seu cultivo começou em 1920, inicialmente para a utilização como forrageira, mas o grão ganhou maior destaque a partir de 1941 e, em meados de 1960, as áreas de produção de soja cresceram exponencialmente (EMBRAPA, 2004). Tanto no Brasil, como no resto do mundo, a soja é, dentre as culturas de grãos, a que mais cresceu nos últimos 30 anos. Os registros indicam um aumento de mais de 330% na sua produção global, no período de 1970 até 2003 (EMBRAPA, 2004; GUIMARÃES; ALVAREZ, 2011).

No Brasil, a produção de soja iniciou-se na região sul, entre os anos 1960 e 1970. Apenas nos anos 1980, a soja foi introduzida no cerrado brasileiro, período em que se tornou o principal produto do agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2004; GUIMARÃES; ALVAREZ, 2011). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. Na safra 2013/2014, o Brasil produziu 86,70 milhões de toneladas, enquanto os EUA teve uma produção de 91,39 milhões de toneladas. A projeção para a safra 2014/2015 deixa o Brasil, ainda, como segundo maior produtor mundial deste grão, com uma produção de 94,00 milhões de toneladas e os EUA com a perspectiva de produção de 106,87 milhões de toneladas (USDA, 2014). Os principais produtores de soja no Brasil são os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente (CONAB, 2014).

A área de plantio da soja, no território brasileiro, para a safra 2012/2013 foi de aproximadamente 27,74 milhões de hectares, indicando um aumento de 9,2% em relação a safra de 2011/2012, que foi de 25,04 milhões de hectares (CONAB, 2013). A área de plantio para a safra de 2013/2014 foi de 30,17 milhões de hectares e a projeção de plantio da safra 2014/2015 está entre 30,88 e 31,70 milhões de hectares, o que equivale a um aumento de 2,3% a 5,3% na área plantada (CONAB, 2014). Em 2010, a exportação da *commodity* de soja foi o equivalente a 9% de toda a exportação brasileira, respondendo por 1,25% do PIB nacional (GUIMARÃES; ALVAREZ, 2011).

Apesar do evidente crescimento da produção e importância que essa cultura representa para a economia brasileira, é possível verificar variações na produção

devido fatores que afetam a lavoura. Todas as culturas, assim como a soja, estão expostas a estresses bióticos e abióticos. Esses fatores podem diminuir drasticamente a produção e a produtividade das culturas, dependendo de sua intensidade (BONATO, 2000; VARSHNEY et al., 2009).

Os principais fatores abióticos que influenciam na produtividade das culturas é a deficiência ou excesso de água no solo, e os extremos de temperatura. Fatores como, fertilizantes, deficiência ou excesso de nutrientes, defensivos químicos, entre outros também são considerados importantes fatores abióticos e podem ter forte influência nos rendimentos da cultura (BONATO, 2000).

Um dos exemplos de como o efeito abiótico pode interferir na produtividade foi observado na safra de soja de 2011/2012. Um fenômeno climático, conhecido como “La Niña”, foi responsável pelo longo período de estiagem ocorrido nas regiões Sul, parte do Sudeste, no sudoeste do Mato Grosso do Sul e no nordeste brasileiro, que resultou na redução de 8,95 milhões de toneladas na produção da soja registrada na safra 2011/2012 (66,37 milhões de toneladas), em relação à safra 2010/2011 (75,32 milhões de toneladas) (CONAB, 2012).

De modo similar, fatores bióticos podem ter impacto direto na produtividade da soja no Brasil, principalmente por se tratar de um país com clima tropical. Atualmente, no Brasil, as principais doenças que afetam a cultura da soja são as pragas, como os percevejos e as lagartas *Helicoverpa*, bem como as doenças causadas por fungos, em especial a Ferrugem Asiática da Soja, e por nematoides. As doenças provocam perdas anuais entre 15 e 20%, mas lavouras com doenças como a Ferrugem Asiática ou forte parasitismo de nematoides podem apresentar perdas de até 90% na produtividade (EMBRAPA, 2013).

1.3.2. OS NEMATOIDES E A CULTURA DE SOJA

Os agentes bióticos como insetos, fungos, bactérias, vírus e nematoides, quando se inserem em uma área de produção, reduzem o rendimento da lavoura, assim como os agentes abióticos ou a interação entre esses dois fatores. Os agentes bióticos podem provocar doenças, infectando as plantas em diferentes estágios de desenvolvimento. A severidade da doença depende da compatibilidade entre os agentes causadores e a planta (BONATO, 2000).

Os nematoides são muito abundantes e ocupam diversos nichos ecológicos. A maioria são de vida livre, porém alguns podem parasitar os animais, como o homem, e as plantas, causando uma variedade de problemas. Na agricultura, esses patógenos afetam inúmeras culturas (BIRD; OPPERMAN; DAVIES, 2003; PARKINSON et al., 2004), sendo considerados parasitas economicamente importantes (YAMAMOTO; HAYASHI, 2002). Uma vez que as perdas na produção, causadas pelos nematoides podem variar de leves até o comprometimento de toda a produção (MENDES; RODRIGUEZ, 2000).

Para evitar os danos provocados por estes organismos patogênicos, faz-se necessária a prevenção pelo uso de cultivares resistentes e/ou melhor adaptadas a uma determinada região; pelo acompanhamento das condições e possíveis contaminações do solo; pela rotação de culturas, com o plantio de uma espécie não hospedeira; e manejo adequado do solo (BONATO, 2000; SILVA et al., 2001), além do controle químico e biológico do solo (ARAUJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012).

Em relação ao seu estilo de vida, os nematoides podem ser sedentários ou migratórios, e para os dois estilos, exo ou endoparasitas. Os migratórios se alimentam das células de plantas e, como não estabelecem um sítio fixo de alimentação, na maioria das vezes não provocam modificações celulares, como o *Radopholus spp.* e *Pratylenchus spp.* (BAKHETIA et al., 2005). Dentro do grupo dos sedentários, estão os nematoides de galha (*Meloidogynes*) e os de cisto (*Heterodera* e *Globodera*), estes são os de maior importância econômica (BAKHETIA et al., 2005; WILLIAMSON; GLEASON, 2003).

Os nematoides sedentários promovem modificações nas células das raízes das plantas hospedeiras, provocando diferenciações para viabilizar o seu desenvolvimento, alimentação e reprodução. Por exemplo, os nematoides de galha que formam as “células gigantes” (estruturas induzidas por mitose sem a presença da fase de citocinese) e os nematoides de cisto que formam o sincítio (estrutura formada pela dissolução das células adjacentes) (BAKHETIA et al., 2005; WILLIAMSON; GLEASON, 2003).

Em todo o mundo, mais de 100 espécies de nematoides estão associadas à cultura da soja. Os nematoides, do gênero *Meloidogyne spp.*, formadores de galha são os principais causadores de danos à sojicultura brasileira. Outro nematoide importante é o de cisto (*Heterodera glycines*), que apareceu pela primeira vez na safra de 1991/1992 e, atualmente, está presente em pelo menos 10 estados

brasileiros (Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Tocantins e Maranhão) (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; DIAS et al., 2010).

Ainda há a presença dos nematoides de lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus*, que estão distribuídos em grande parte do Brasil; e o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) que afeta principalmente a cultura de algodão, mas vêm provocando danos cada vez maiores na cultura de soja (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; DIAS et al., 2010).

1.3.3. NEMATOIDES DE GALHA

No Brasil, as principais espécies de nematoides de galha ou meloidogines são a *Meloidogyne javanica* e a *Meloidogyne incognita*, causando grandes danos a agricultura (ALMEIDA; SEIXAS, 2010; BONATO, 2000), constituindo um problema para as regiões produtoras há mais de 40 anos (MENDES; RODRIGUEZ, 2000).

Os nematoides de galha foram registrados em solo brasileiro após a introdução da cultura de soja (ALMEIDA; SEIXAS, 2010). Os meloidogines são amplamente distribuídos, principalmente no norte do Rio Grande do Sul, sudoeste e norte do Paraná, sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul e em diversos pontos nos cerrados do Centro-Oeste (EMBRAPA, 2004; FUGANTI et al., 2004; SILVA et al., 2001). A ocorrência de *M. incognita* no solo foi associada, anteriormente, às regiões de cultivo de café e algodão, enquanto a de *M. javanica* foi mais generalizada. Além disso, os danos causados às plantas pelo parasitismo dos nematoides podem ser decorrentes das pelas variações de temperatura e umidade, que alteram o metabolismo, a atividade e, conseqüentemente, o ciclo reprodutivo do fitopatógeno, tornando sua infecção mais ou menos agressiva (ALMEIDA; SEIXAS, 2010).

Os nematoides de galha atacam as raízes das plantas, tornando-as deformadas e engrossadas; com a formação de galhas ocorre a redução da absorção de nutrientes e água pela planta, dificultando o seu crescimento e desenvolvimento (ARAUJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012), levando aos sintomas de clorose e redução de tamanho. Em geral, esses sintomas são observados, de forma mais acentuada, em pontos específicos nas lavouras, as chamadas reboleiras (manchas circulares no meio da lavoura) (BONATO, 2000; DIAS et al., 2010;

EMBRAPA, 2011). Outros sintomas ocasionados pela infecção por nematoides de galha é o intenso abortamento de vagens (ALMEIDA; SEIXAS, 2010). O número e o tamanho das galhas nas raízes das plantas infectadas dependem da densidade populacional do patógeno e da susceptibilidade da cultivar de soja (EMBRAPA, 2011).

O ciclo de vida de espécies do gênero *Meloidogyne* (Figura 1) depende de vários fatores, dentre eles a temperatura, que para o desenvolvimento desses nematoides deve estar entre 15°C e 30°C. O ciclo de vida demora em média 25 dias quando a temperatura fica em torno de 27°C, passando por 5 estágios (ALMEIDA; SEIXAS, 2010). O desenvolvimento se inicia no ovo; após a eclosão do ovo, o nematoide se encontra como juvenil de segundo estágio (J2), que é a forma infectante. Ao entrar na raiz, ocorre a migração para o tecido vascular, local onde começa a se alimentar promovendo modificações celulares para se instalar e se tornar sedentário. Neste local, o nematoide se desenvolve e passa por mais 3 mudas até chegar a maturidade (GHEYSEN; FENOLL, 2002; WILLIAMSON; GLEASON, 2003).

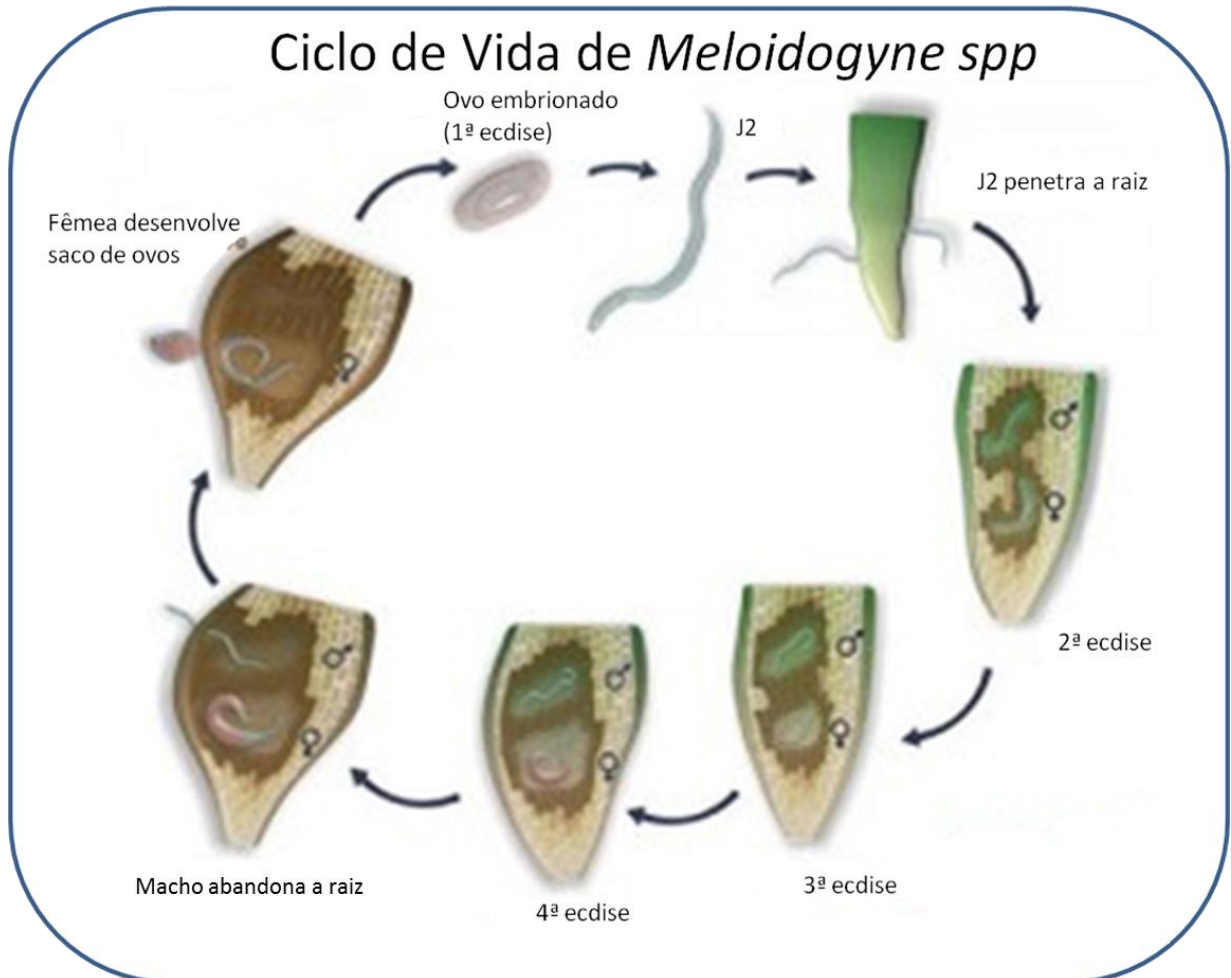


Figura 1: ciclo de vida de espécies do gênero *Meloidogyne*. Após a eclosão do ovo, o nematoide no juvenil de segundo estágio (J2) infecta a raiz, passa por mais 3 mudanças até chegar a maturidade. O macho apresenta motilidade e abandona a raiz e a fêmea se torna sedentária. Após se estabelecer, a fêmea, produz ovos que são liberados na superfície da raiz protegida por uma matriz gelatinosa (<http://www.nematoides.com.br/page/sintomasdetalhes.aspx?chave=meloidogyne-incognita>).

A reprodução das meloidogines geralmente é por partenogênese amiótica (GHEYSEN; FENOLL, 2002), o que contribui para uma menor variabilidade genética (SILVA, 2001). As fêmeas adultas são bulbosas e sem motilidade (WILLIAMSON; KUMAR, 2006), com formato de pera e cor branco-pérola (ALMEIDA; SEIXAS, 2010). Estas começam a produzir ovos após 3 a 6 semanas depois da penetração na raiz (WILLIAMSON; KUMAR, 2006). As fêmeas do gênero *Meloidogyne* são capazes de produzir centenas de ovos, que são liberados na superfície da raiz junto a uma substância gelatinosa que serve de proteção (GHEYSEN; FENOLL, 2002). A matriz gelatinosa, que protege os ovos, é secretada por glândulas no reto da fêmea e sua produção inicia-se antes da produção dos ovos e continua enquanto são

produzidos (ALMEIDA; SEIXAS, 2010). Já os machos, se tornam vermiformes e com motilidade, deixando as raízes infectadas (WILLIAMSON; KUMAR, 2006). A população desses nematoides é essencialmente de fêmeas, podendo apresentar várias gerações sem a presença de machos. Os machos aparecem geralmente em situação de estresse nutricional (FERRAZ, 2001).

Para infectar uma planta hospedeira este nematoide utiliza estruturas específicas: o estilete e as glândulas de secreção esofágicas, que produzem secreções (contendo várias enzimas) que possibilitam a modificação celular e consequente formação das “células gigantes”, sítios de alimentação (GHEYSEN; FENOLL, 2002; WILLIAMSON; GLEASON, 2003). O início da formação das “células gigantes” é o aparecimento de várias células binucleadas, depois há a formação de células multinucleadas devido a vários processos de mitose, enquanto isso células vizinhas incham e se dividem, formando a galha (GHEYSEN; FENOLL, 2002). Sucessivas mitoses ou divisões celulares induzida ocorrem sem ocorrer a citocinese (WILLIAMSON; GLEASON, 2003).

As “células gigantes” apresentam vários núcleos aumentados, retículo endoplasmático liso, ribossomos, mitocôndrias, plastos e vacúolos pequenos, além disso, apresentam aumento na espessura da parede do xilema devido a invaginações digiformes, que facilitam o transporte de água para o fitopatógeno (GHEYSEN; FENOLL, 2002). Essas estruturas também possuem um citoplasma denso, indicando elevada atividade metabólica (BARCALA et al., 2010; WILLIAMSON; KUMAR, 2006).

Devido ao estímulo do próprio endoparasita uma constante atividade metabólica das células o nutre. Durante a alimentação do nematoide, ele insere o estilete através da parede celular, sem que ocorra a perfuração da membrana plasmática, então retira o nutriente a partir do citossol da célula de alimentação. Junto com o estilete uma estrutura conhecida como tubo de alimentação é inserida no sítio de alimentação, uma nova estrutura é formada cada vez que o estilete é reinsertado, podendo haver vários tubos de alimentação associados às “células gigantes”. Essa associação entre o sítio de alimentação e os tubos de alimentação sugere que esta estrutura funcione como transporte de nutrientes (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996).

Um dos métodos para reduzir os danos provocados pelas *Meloidogenoses* na produção da soja é a utilização de genótipos resistentes, porém, no Brasil, há

poucas cultivares resistente a esses patógenos (ARAUJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012) e a maioria descende de uma única cultivar norte-americana, a “Bragg” (EMBRAPA, 2013), com isso é verificado a importância da introdução de novas fontes de genes de resistência (SILVA; FERRAZ; ARIAS, 2001). Além da utilização de cultivares resistentes, é necessário a utilização de outras técnicas de prevenção associadas para se obter melhores resultados na prevenção ao ataque desses parasitas (ARAUJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012), como a rotação de culturas utilizando culturas resistentes ou não hospedeiras nas regiões afetadas (EMBRAPA, 2013).

1.3.4. EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES PARA ESTUDO DA FUNÇÃO GÊNICA

A transformação genética é a transferência de um gene de interesse para o genoma de um organismo de forma controlada, com o intuito de estudar a expressão desse gene (ANDRADE, 2003; SANTARÉM, 2000). Para a transformação é essencial a identificação, isolamento e clonagem do gene de interesse para depois ocorrer a sua introdução na célula ou tecido (ANDRADE, 2003; SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008).

A expressão transiente de um gene é a alternativa para a transformação estável, quando o intuito é analisar a função de um gene, pois esta técnica reduz o tempo da pesquisa drasticamente (LI et al., 2009). Este é um sistema útil por ser rápido e flexível, além de poder ser utilizado em tecidos diferenciados de plantas (VOINNET et al., 2003). O bombardeamento por biobalística, a transfecção de protoplastos e a transformação via *Agrobacterium* são as técnicas utilizadas para esse tipo de estudo (LI et al., 2009), sendo que o método a ser utilizado vai depender do objetivo final e do tecido celular a ser transformado.

A transformação pode ocorrer de forma indireta, onde utiliza-se um vetor intermediário para a transferência do DNA, como a técnica de transformação via *Agrobacterium*, ou de forma direta, que utiliza métodos químicos ou físicos, como a biobalística e a eletroporação (ANDRADE, 2003; SANTARÉM, 2000; SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008), sendo que o método a ser utilizado vai depender do objetivo final e do tecido celular a ser transformado (SANTARÉM, 2000).

A biobalística é uma técnica que pode ser utilizada em uma grande variedade de plantas, porém o principal aspecto negativo é a eficiência de transformação muito baixa (LI et al., 2009), entre 1 e 5%. Este método foi descrito por Sanford et al. (1987), e consiste no bombardeamento de células ou tecidos com micropartículas de ouro ou tungstênio (metais inertes) envolvidos com o DNA de interesse. Essas partículas são aceleradas por explosão química, descarga de gás hélio a alta pressão ou pela vaporização de uma gota de água, visando a penetração na parede celular e na membrana plasmática da célula, sem ser letal. Após a entrada da partícula contendo o gene de interesse na célula, devido à ação do líquido celular, ocorre a dissociação da micropartícula e do DNA, sendo possível a integração do gene ao genoma da planta (ANDRADE, 2003).

A principal vantagem da técnica de biobalística é poder ser aplicada a vários tipos de célula e tecidos (como suspensões, calos, tecidos meristemáticos, embriões imaturos e embriões somáticos) (HOMRICH et al., 2012; SANTARÉM, 2000). Além da baixa eficiência, devido a entrada do DNA nas organelas celulares de forma aleatória, outra desvantagem é a produção de genes quiméricos ou a integração de várias cópias integradas ao genoma em diferentes posições. Essa integração de forma aleatória no genoma pode promover o silenciamento ou a alteração da expressão dos genes introduzidos (ANDRADE, 2003; HOMRICH et al., 2012). Isto ocorre, pois não há uma forma de controlar o local ou a quantidade de micropartículas introduzidas em cada célula.

A transfecção de protoplasto é utilizada para estudar a regulação e respostas de células autônomas de forma quantitativa e com alto rendimento. Em estudos que a parede celular ou os tecidos são importantes, não é possível a aplicação desta técnica (LI et al., 2009), pois os protoplastos são células sem a parede celular. Para introduzir uma molécula de DNA nesta célula, é necessário colocá-la na presença do DNA exógeno e aplicar pulsos curtos de uma corrente contínua e alta voltagem; com isso poros temporários são formados na membrana promovendo uma permeabilidade reversível (SANTARÉM, 2000), permitindo, dessa forma, a entrada do DNA (VIDAL; CARVALHO, 2002).

Na transformação mediada por *Agrobacterium*, é utilizada a capacidade da *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* de transferir DNA externo para as células das plantas sem danificar a parede celular da mesma (LI et al., 2009), utilizado o DNA de transferência (T-DNA). Esse foi o primeiro método de transformação desenvolvido

(ANDRADE, 2003), e é considerado um método indireto, por utilizar uma bactéria para transmitir o gene de interesse. Os genes que induzem a formação de tumores (*A. tumefaciens*) e raízes (*A. rhizogenes*), os oncogenes, podem ser retirados ou inativados, desarmando os plasmídeos Ti ou Ri, respectivamente (SANTARÉM, 2000). Nesta técnica, o gene de interesse é inserido entre as bordas direita e esquerda do T-DNA (sequências repetidas de 25pb que são responsáveis pela transferência do T-DNA). Para ocorrer a transferência DNA para o genoma da planta, genes da região de virulência são expressos promovendo a transferência do T-DNA para a planta (VIDAL; CARVALHO, 2002).

Uma das desvantagens desta técnica é que não pode ser aplicada em todos os tipos de plantas, portanto, para ser eficiente, é necessária avaliação da interação entre a *Agrobacterium* e a planta a ser transformada. Algumas dicotiledôneas, a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas, não são suscetíveis ao método de transformação (ANDRADE, 2003; SANTARÉM, 2000); e sua capacidade de regeneração de tecidos (regenerar novas plantas) é muito baixa (ANDRADE, 2003).

1.3.5. TRANSFORMAÇÃO VIA *Agrobacterium rhizogenes*

As agrobactérias são conhecidas pela capacidade de transferir o seu material genético para o genoma da planta infectada, onde são integrados e replicados como se fossem da própria planta, o que implica no desenvolvimento de tumores ou raízes adventícias na região da infecção (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004).

Para ocorrer a infecção de uma planta por *Agrobacterium*, primeiro há o reconhecimento e a ligação da bactéria à célula vegetal. Isso ocorre por quimiotaxia, quando o tecido vegetal lesionado exuda compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos, que atraem a bactéria. Em contato com a célula lesionada, a bactéria sintetiza microfibrilas de celulose, que induz a formação de agregados de células bacterianas ao redor do tecido vegetal ferido (BRASILEIRO; LACORTE, 2002). Os genes cromossomais são os responsáveis pelo reconhecimento e interação bactéria-planta (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004).

A *Agrobacterium rhizogenes* é uma bactéria gram-negativa, pertence à família *Rhizobiaceae* (PIRIAN; PIRI; GHIYASVAND, 2012; SANTARÉM, 2000;

WEBER; BODANESE-ZANETTINI, 2011), e patogênica de solo, que infecta as dicotiledôneas, induzindo proliferação de raízes adventícias no local da infecção. Também conhecida como formadora de “cabeleira”, termo utilizado principalmente em raízes transformadas (ALPIZAR et al., 2008). As condições ideais para o sua proliferação são locais com a temperatura entre 25-30°C e infectam somente tecidos lesionados das plantas (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004).

Para infectar as células vegetais, a *A. rhizogenes* utiliza o plasmídeo *Ri* (*root-inducing - A. rhizogenes*), de alto peso molecular (150 a 250 kb) (BRASILEIRO; LACORTE, 2002; VIDAL; CARVALHO, 2002), elemento não cromossomal destas bactérias (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004). Compostos liberados pela planta, os fenóis, ativam genes que se encontram na região de virulência (*vir*) no T-DNA. A região *vir* é composta por 6 a 8 *operons* que contém 25 genes no total. A indução desses genes produz proteínas que promovem a transferência do T-DNA para o núcleo da célula vegetal (BRASILEIRO; LACORTE, 2002; VIDAL; CARVALHO, 2002).

Os compostos fenólicos liberados pela planta que está sendo infectada ativam os genes *vir*, com isso ocorre a clivagem de uma das bordas do T-DNA, e uma nova fita é sintetizada (síntese que se inicia pela borda direita). Esta fita simples de T-DNA se liga a várias proteínas e o complexo formado é transportado para o núcleo da célula vegetal. Quando este complexo está no núcleo, é integrado ao genoma da planta por recombinação ilegítima, com preferência por regiões ativas do genoma (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004).

O T-DNA é responsável pela síntese de hormônios que provocam a diferenciação e proliferação celular, induzindo a formação dos tumores e/ou raízes adventícias. Também são responsáveis pela síntese de opinas (compostos derivados de aminoácidos e açúcares), utilizados como nutrientes apenas para as bactérias (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004);conforme o tipo de opina sintetizada, como as agropinas, manopinas ou cucumopinas, a *Agrobacterium* é classificada em relação a sua linhagem e espécie (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004; VEENA; TAYLOR, 2007; VIDAL; CARVALHO, 2002).

O T-DNA é delimitado por duas sequencias repetidas de 25pb (extremidade direita e esquerda) (BRASILEIRO; LACORTE, 2002), e pode ser segmento único ou separado em dois. Na região T_R do T-DNA do plasmídeo Ri são encontrados os genes responsáveis pela síntese de auxina e das opinas, assim como ocorre nas *A.*

tumefaciens (plasmídeo Ti) (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004). Já a região T_L nos plasmídeos Ri, apresenta quatro genes específicos, e são considerados os responsáveis pela indução das raízes adventícias provenientes do tecido neoplásico, os genes *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD* (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004; MANKIN et al., 2007; ROYCHOWDHURY; MAJUMDER; JHA, 2013). As cepas com T-DNA com segmento único apresentam características da região T_L (VEENA; TAYLOR, 2007).

Os genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento são o *rol* e a *aux* (ALPIZAR et al., 2008). Os genes *rol* (*root locus* – locus de raiz) atuam de forma sinérgica, alterando parâmetros morfológicos e garante o sucesso da infecção. O gene *rolA* é o que causa maior alteração morfológica, tendo o promotor ativo em todos os órgãos, em níveis diferentes. O gene *rolB* é o mais eficiente na indução de raízes e quando inativado, é o único, que suprime a indução de raízes. O *rolD* potencializa a organogênese floral em culturas de célula (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004). Por exemplo, o *rolB* é o mais eficiente na indução de formação de raízes, sendo responsável pela indução de raízes adventícias no caule e em segmentos foliares cultivados. Esses genes presentes em plantas inteiras transformadas geram características como entrenós curtos, folhas enrugadas, raízes com ampla ramificação lateral e também a formação de alguns metabólitos *rolD* (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004; MANKIN et al., 2007; ROYCHOWDHURY; MAJUMDER; JHA, 2013).

Nas *A. rhizogenes*, a indução do tecido neoplásico é organizada, formando raízes adventícias provenientes de uma única célula transformada; quando cultivada *in vitro* podem regenerar plantas férteis (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004).

Devido ao seu tamanho, não é possível manipular diretamente o plasmídeo Ri, por isso plasmídeos menores e fáceis de manipular foram desenvolvidos. Estes são denominados de vetores binários e possuem as extremidades do T-DNA e entre eles o gene de interesse deve ser clonado. O vetor binário é transferido para a linhagem de *Agrobacterium*, que pode ser feito por conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico (BRASILEIRO; LACORTE, 2002).

Ao utilizar a técnica de transformação via *A. rhizogenes* é possível produzir raízes transformadas *in vitro* (ALPIZAR et al., 2006), ou também plantas compostas ou quiméricas, que possuem raízes adventícias transformadas e o restante da planta não (WEBER e BODANESE-ZANETTINI, 2011). Para realizar esta técnica são utilizadas cepas de *A. rhizogenes* de baixa virulência (número de plasmídeo

transferidos é limitado, de maneira que o crescimento e morfologia das raízes transformadas possam ser comparados a raízes normais), como a *Arqua-1* e *K599* (CHABAUD et al., 2006).

Por exemplo, a cepa *K599* se enquadra nas que produzem a opina cucumopina (SAVKA et al., 1990) que apresentam apenas uma região de T-DNA. Esta única região de T-DNA possui apenas genes *rol* (*root locus* – locus de raiz), que são considerados responsáveis pela indução da formação das raízes. As cepas produtoras de cucumopinas apresentam apenas os genes *rolA*, *rolB* e *rolC*, não apresentando o gene *rolD* e os responsáveis pela produção de auxinas (VEENA; TAYLOR, 2007).

As raízes transformadas são morfológica e fisiologicamente diferentes de uma raiz normal, crescem mais rápido, são altamente ramificadas e tendem a crescer horizontalmente (plagiotropia). Essas raízes são mais adaptadas para crescer em cultura axênica (VERDEJO; JAFFEE; MANKAU, 1988) e tem a capacidade de continuar crescendo mesmo depois de retiradas da planta. Devido a existência dos genes que regulam a biossíntese e a sensibilidade à auxina nas raízes transformadas pela *A. rhizogenes*, elas apresentam maior crescimento das raízes. A variação no aspecto das raízes formadas, como a intensidade de crescimento, o diâmetro da raiz e a taxa de crescimento é influenciada pela integridade dos genes contidos no T-DNA no genoma do hospedeiro (ALPIZAR et al., 2008).

A expressão transiente de genes em raízes transformadas com *A. rhizogenes* vem sendo utilizada para a produção de metabólitos secundários usados comercialmente, para estudos de genes envolvidos na morfologia e desenvolvimento da planta, na fixação de nitrogênio e na resistência a patógenos específicos de raiz, como os nematoides (ALPIZAR et al., 2008), constituindo uma alternativa para se obter uma avaliação rápida das respostas da planta a estes importantes processos e estresses (LI; TODD; TRICK, 2010).

Na soja, a metodologia vem sendo utilizado para caracterização de promotores tecido-específicos, em estudos com nematoides (propagação, simbiose e interação patogênica) (WEBER; BODANESE-ZANETTINI, 2011) e análise funcional de genes de resistência (CHABAUD et al., 2006).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de estabelecer a técnica de transformação via *Agrobacterium rhizogenes* em diferentes tipos de plantas. Por

exemplo, Aarrouf et al. (2012) transformaram o hipocótilo e explantes de folhas da pimenta *Capsicum annuum*, inserindo vetores que continham o gene *gus* e *gfp*, apresentando um resultado expressivo de transformação nos explantes foliares com o vetor contendo o gene *gfp*. A técnica foi utilizada com sucesso para validação funcional de genes envolvidos na resposta a infecção ao nematoide de galha *Meloidogyne incognita* em *Prunus spp.* Com uma eficiência de transformação de 42%, tanto as raízes transformadas em placas de Petri quanto plantas compostas permitiram detectar diferenças nas respostas em função do gene inserido, sendo possível observar todos os estágios de desenvolvimento do nematoide, e comparar com raízes não transformadas (BOSSSELUT et al., 2011).

A otimização da técnica de transformação via *Agrobacterium* para produzir plantas compostas em *Eucalyptus camaldulensis* resultou em uma eficiência de transformação de 68%, e também identificou a melhor composição do meio para o desenvolvimento da planta composta, onde a solução de Hoagland apresentou 73,3% de sobrevivência das plantas (BALASUBRAMANIAN et al., 2011).

Vários estudos de validação funcional de genes em soja e/ou de fitoparasitas, como nematoides, utilizando raízes transgenes, via *Agrobacterium rhizogenes*, vem sendo utilizados com sucesso. Ibrahim et al. (2011) utilizaram a metodologia para silenciar quatro genes do nematoide *Meloidogyne incognita*. Após a infecção das raízes com os nematoides e possível assimilação dos *siRNAs* produzidos, a formação de galhas foi inibida em 94,7% e 91,9% quando os genes tirosina fosfatase e o precursor da proteína de estresse-70, respectivamente, foram silenciados

Li, Todd e Trick (2010), produziram raízes de soja transformadas com construções de RNA interferentes (RNAi) para os genes Fib-1 e Y25C1A.5, envolvido na reprodução do nematoide de cisto *Heterodera glycines*. Ao silenciar esses genes foi identificada uma redução significativa do número de cistos por grama de raiz, confirmando a importância dos mesmos na saúde e reprodução do nematoide.

A metodologia também foi utilizada com sucesso para validação funcional do gene candidato à resistência ao nematoide do cisto, silenciando com sucesso o gene com estrutura LRR-kinase (Região rica em leucina com receptor transmembrana cinase) presente no locus *Rgh1*. Com o trabalho foi possível

demonstrar que este gene não contribui na resistência da soja ao nematoide *Heterodera glycines* (MELITO et al., 2010).

Baseado nos diferentes trabalhos acima apresentados ressalta-se a importância do sistema de produção de raízes transgenes em plantas para o estudo funcional de genes de resposta a diferentes estresses bióticos, bem como abióticos, e na interação planta-patógeno.

1.3.6. ANÁLISE POR RT-QPCR E IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO DOS GENES NORMALIZADORES

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em etapas distintas que ocorrem em temperaturas diferentes: desnaturação do DNA, na qual as pontes e hidrogênio são desfeitas e ocorre a abertura da dupla fita do DNA; a fase de anelamento do par de iniciadores (oligonucleotídeos) com base na similaridade entre as sequências alvo e do iniciador; e a etapa de extensão, sintetizando a fita complementar, reação catalisada pela enzima DNA polimerase (REBOUÇAS et al., 2013; REECE, 2004). A eficiência e especificidade da reação dependem do tamanho do fragmento amplificado, especificidade da hibridização e a temperatura de anelamento dos iniciadores (REBOUÇAS et al., 2013).

Uma variação do PCR tradicional é a PCR em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR). Esta técnica é utilizada em diferentes áreas da genômica funcional, visando correlacionar níveis de expressão em situações específicas com a função do gene em análise (REBOUÇAS et al., 2013). Este método é principalmente utilizado para a quantificação da expressão gênica, contribuindo para uma melhor compreensão dos processos metabólicos e redes de sinalizações, que são a base dos processos e desenvolvimento celular (BUSTIN, 2000; HU et al., 2009), permitindo determinar quais genes tem maior relevância na regulação destes processos (VANDESOMPELE et al., 2002).

Em contraste com as quantificações nos ciclos finais da PCR convencional (“end points”), a PCR em tempo real monitora a reação ciclo a ciclo, com a associação da amplificação do alvo em cada ciclo e a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. Como o aumento da fluorescência emitida em cada ciclo é proporcional à quantidade do produto gerado, durante a fase exponencial da

reação é possível monitorar amplificação gerada, onde a quantidade de fragmento amplificado é proporcional à quantidade inicial.

Para ser possível tal metodologia, associado à amplificação é necessário que haja emissão de fluorescência, além de uma plataforma de instrumentação capaz de detectar e captar a fluorescência produzida. Para isso foi desenvolvido um tipo especial de termociclador, que além das ciclagens das temperaturas, apresenta um sistema ótico para excitação da fluorescência e uma câmera CCD que garante a captação da fluorescência produzida. Para a associação da amplificação do fragmento alvo com a emissão de fluorescência, várias metodologias de quantificação baseada em PCR em tempo Real vêm sendo desenvolvidas atualmente. Estas variam na especificidade do alvo de amplificação, custo, precisão e mão de obra. Dentre estas metodologias, as mais utilizadas são as TaqMan e SYBR green.

Para a análise de RT-qPCR, o RNA não pode ser utilizado como a base para o PCR, portanto inicialmente é necessária a realização da transcrição reversa onde o RNA utilizado como padrão é transformado em cDNA, para depois ser realizado na amplificação exponencial pela reação de PCR. A transcrição reversa pode ser uma etapa separada da PCR, gerando amostras de cDNA que podem ser armazenadas (BUSTIN, 2000). A quantidade de cDNA produzida pela transcriptase reversa deve representar com precisão a quantidade de RNA (BUSTIN, 2002).

A quantificação dos níveis de expressão é possível, pois a medida é conduzida no intervalo linear da reação de amplificação, onde a quantidade de RNAm amplificado é diretamente proporcional à quantidade inicial, considerando uma eficiência constante ao longo dos ciclos iniciais da PCR (SCHMITTGEN et al., 2000). Com este método é possível quantificar a expressão de genes em várias amostras diferentes, para um número de genes estipulados (SILVER et al., 2006).

No RT-qPCR o fragmento de interesse é amplificado e simultaneamente quantificado, utilizando moléculas fluorescentes como o corante *SYBR Green*, que se ligam ao DNA de dupla fita e emitem fluorescência quando excitado (BUSTIN, 2000; GUÉNIN et al., 2009; LE et al., 2012; MULLER et al., 2002; PFAFFL, 2001; REBOUÇAS et al., 2013; SCHMITTGEN et al., 2000). A fluorescência é maior conforme maior o número de cópias do alvo na amostra, de modo que quanto mais DNA estiver presente na amostra contendo o alvo de interesse, maior será a intensidade do sinal gerado (REBOUÇAS et al., 2013). O corante que não está

ligado ao DNA não emite fluorescência (BUSTIN, 2000); desse modo, conforme ocorre a síntese de DNA dupla fita, mais moléculas de corante se associam ao DNA polimerizado, e a fluorescência emitida aumenta proporcionalmente, sendo detectada em um comprimento de onda específico, detectada a cada ciclo de amplificação por um detector a laser (REBOUÇAS et al., 2013). Além da metodologia SYBR, o sistema Taqman, que combina iniciadores e sondas para detecção do alvo, também é amplamente utilizado em análises de RT-qPCR. Nesse sistema, a fluorescência é gerada a cada ciclo em função da quebra da sonda anelada ao alvo, utilizando a atividade de 5' exonuclease da DNA polimerase (GUÉNIN et al., 2009; LE et al., 2012; MULLER et al., 2002; SCHMITTGEN et al., 2000).

Quando o sinal de fluorescência atinge um limiar ("*threshold*") definido, na fase exponencial da amplificação, o Ct (ciclo limiar) é determinado (GUÉNIN et al., 2009; LE et al., 2012; LIU; SAINT, 2002; REBOUÇAS et al., 2013). Portanto, o Ct é definido pelo número de ciclos de amplificação necessária para a fluorescência cruzar o limiar, neste ponto a concentração de cDNA inicial é inversamente proporcional ao Ct, quanto maior quantidade de cópias menor a quantidade de ciclos necessário para cruzar o limiar. Como o corante SYBR Green se liga indiscriminadamente em qualquer DNA dupla fita, é necessário verificar se está ligado a apenas um produto de PCR e que não há contaminação, para tanto as amostras são submetidas ao protocolo de dissociação, logo após o final dos ciclos de PCR, onde a temperatura é aumentada lentamente, como a temperatura de fusão depende da sua composição de nucleotídeo é possível obter o sinal do fragmento amplificado observando um pico característico da temperatura de fusão deste fragmento analisado (BUSTIN, 2000; SCHMITTGEN et al., 2000).

O RT-qPCR é uma das principais técnicas para quantificar a expressão de genes (análise de RNAm) (DEKKERS et al., 2012; HUGGETT et al., 2005; MULLER et al., 2002; PFAFFL, 2001), pois é um método altamente sensível, permitindo a quantificação de pequenas mudanças na expressão dos genes (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; HUGGETT et al., 2005; LE et al., 2012; LIU; SAINT, 2002; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN et al., 2000) – com isso possibilita a detecção de RNAm raros, em pequenas quantidades e que são expressos em uma mistura de células (SCHMITTGEN et al., 2000), permite a comparação nos níveis de RNAm em diferentes populações, para a caracterização de expressões padrão de RNAm, para

discriminar RNAm intimamente relacionados e para a análise da estrutura no RNA (BUSTIN, 2000) –, apresenta alta especificidade, uma vez que utiliza iniciadores específicos para os genes a serem analisados (LE et al., 2012), também é considerado um método rápido e preciso, com boa reprodutibilidade, alcance dinâmico e alto rendimento (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; DEKKERS et al., 2012; HU et al., 2009; HUGGETT et al., 2005; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN et al., 2000). A quantificação do RNAm por esta técnica pode ocorrer de forma absoluta ou relativa (compara o gene alvo a um gene de referência) (LIU; SAINT, 2002; PFAFFL, 2001).

Nas análises realizadas via RT-qPCR, as amostras de RNA podem apresentar diferenças na quantidade e integridade deste RNA, nas eficiências da síntese de cDNA (Transcrição reversa) e da PCR propriamente dita. Essas variáveis podem causar erros de quantificação, de modo que para tentar diminuir a interferência gerada é necessária a utilização de normalizadores, como genes de controle interno ou de referência (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; DEKKERS et al., 2012; HUGGETT et al., 2005; LE et al., 2012; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000).

O gene ideal para ser utilizado como normalizador deve apresentar expressão constante nos diferentes tecidos e ao longo do ciclo, bem como sob a condição tratamento de estudo (HU et al., 2009; LE et al., 2012; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000). Geralmente a expressão é constitutiva e estes genes estão relacionados com processos básicos e estruturais da célula (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; DEKKERS et al., 2012; HU et al., 2009; PFAFFL, 2001).

Os padrões de expressão gênica variam em diferentes células ou tecidos, entre os estágios de desenvolvimento e de metabolismo e quando estão sob influência de compostos. Vários estudos demonstraram que os genes podem variar dependendo das condições experimentais (HU et al., 2009; PFAFFL, 2001), por isso há a necessidade de validar os genes de referência para cada experimento e/ou tecido diferente que for estudado (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; DEKKERS et al., 2012; HU et al., 2009; MULLER et al., 2002).

No RT-qPCR são quantificadas moléculas específicas de RNAm, devido a atividade transcricional de cada tecido ser diferente, a normalização precisa ser baseada na concentração inicial e as amostras devem ser normalizadas conforme a quantidade de RNA total presentes (GUÉNIN et al., 2009). Os níveis de expressão

de um gene alvo é calculado em relação a expressão do gene de referência, por isso a importância de se utilizar um gene de referência que não tenha variação da expressão em diferentes condições de experimentais (MULLER et al., 2002).

O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH – importante enzima da via glicolítica), actina (α - e β -actina – essenciais para a estrutura e cinética do citoesqueleto), tubulina (α - e β -tubulina – TUA e TUB, respectivamente, essenciais para a estrutura e cinética do citoesqueleto), subunidades ribossomais (RNAr 18S ou 28S), ubiquitina (gene envolvido com a degradação proteica), albumina, ciclofilina (importante para o dobramento de proteínas e as interações proteicas), fator de alongamento (ELF1- α e - β), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) são exemplos de genes de referência utilizados como normalizadores (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; HU et al., 2009; HUGGETT et al., 2005; LIBAULT et al., 2008; MIRANDA et al., 2013; MULLER et al., 2002; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000; THELLIN et al., 1999). Todos esses genes citados aparentemente são tidos como de expressão constitutiva, mas variações na sua expressão já foram descritas, dependendo do tecido, ciclo de vida e condições ambientais (MIRANDA et al., 2013).

A seleção de um gene interno para normalização deve levar em consideração o nível de expressão do gene no tecido e/ou célula de interesse, que deve ser constante e apresentar uma variação mínima na sua expressão em diferentes amostras e em diferentes tratamentos.

Atualmente diferentes estratégias tem sido desenvolvidas para a identificação de genes de controle interno ou referência, que empregam novos modelos matemáticos para a análise dos dados (BUSTIN, 2002). Há vários programas disponíveis para a busca de genes de referência, como o Genorm, o BestKeeper e o NormFinder. Estas ferramentas permitem encontrar o melhor gene de referência para um grupo de amostras, e se necessário calcular um fator de normalização, quando utilizado vários genes normalizadores em conjunto (DEKKERS et al., 2012; HU et al., 2009).

O Genorm é baseado na comparação de cada gene de controle interno em pares – um gene é comparado com cada um dos outros genes analisados – onde é determinado o desvio padrão entre as taxas de expressão, em forma de logaritmo. Ao final, cada gene de referência apresenta uma medida M, média aritmética dos

desvios-padrão de um determinado gene. Quanto menor o valor de M mais estável é a expressão do gene. Como, supostamente, dois genes de referência deveriam apresentar uma relação constante na expressão, independente da condição ou célula, quando há o aumento da variação indica que um ou ambos os genes comparados não são constantemente expressos. Os genes mais instáveis podem ser eliminados da avaliação. Após a avaliação individual, quando há a necessidade de utilização de mais de um gene normalizador o fator de normalização é calculado por média geométrica (VANDESOMPELE et al., 2002).

O programa BestKeeper inicialmente calcula a média geométrica, média aritmética, valor mínimo e máximo, desvio padrão e coeficiente de variação dos dados plotados para cada gene de referência. Utilizando o desvio padrão e coeficiente de variação o programa identifica como o gene mais estável aquele que tem menor variação. Genes com desvio padrão maior do que 1, são considerados inconsistentes e assim excluídos das análises. Além da identificação dos melhores genes normalizadores (dentre dez), este programa possibilita a análise dos níveis de expressão de mais dez genes alvos, em ambos os casos utilizando até 100 amostras biológicas, e enquanto o Genorm analisa somente a estabilidade dos genes de referencia. O fator de normalização calculado por este programa é determinado realizando uma análise de correlação de par em par dos genes e calcula a média geométrica dos genes mais estáveis (PFAFFL et al., 2004).

O NormFinder utiliza um modelo matemático para estimar a variação de expressão dos genes candidatos a normalizadores de forma intra e intergrupar. Após a estimativa das expressões é realizado um cálculo para estabelecer um valor de estabilidade para cada gene analisado. Esse modelo seleciona os genes com o perfil de expressão mais estável em todo um conjunto de amostras. Quando necessária a utilização de mais de um gene para a normalização o calculo de um fator de normalização é estimado, leva em consideração principalmente a variação intergrupo. Esse fator é considerado ideal quando a sua variação é mínima (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004).

O método de comparação pelo Δ -Ct (Delta-Ct) é baseado no método do programa Genorm, desenvolvido por Vandesompele et al.(2002), no qual há a comparação de par em par dos genes candidatos utilizando uma comparação direta entre os Ct e o desvio padrão do Δ -Ct. Esse método é utilizado principalmente

quando a concentração de RNA for muito baixa e contaminação com proteínas puder interferir na medição (SILVER et al., 2006).

Finalmente, o RefFinder (www.leonxie.com/referencegene.php), combina os principais programas de avaliação de genes de referência (Genorm, BestKeeper, NormFinder, e métodos de comparação do Δ -Ct), com base nos resultados e classificação de cada método. Este programa atribui um peso adequado a cada gene e pelo cálculo da média geométrica define uma classificação global.

Há vários estudos que recomendam a utilização de dois ou três genes quando não há um gene estável o suficiente para ser utilizado como normalizador (LIBAULT et al., 2008). Para cada estudo é importante a identificação dos melhores genes de referência a ser utilizado como normalizador, pois a utilização de normalizadores errados podem levar a conclusões equivocadas em um determinado estudo (DEKKERS et al., 2012; HU et al., 2009). Porém, muitos estudos utilizam um gene de controle interno sem a sua devida validação, apenas supondo o seu papel nos processos celulares básicos (LIBAULT et al., 2008).

Vários trabalhos identificaram e validaram genes de referência para diferentes experimentos e com diferentes plantas, tais com: normalizadores para ao estudo em diferentes estágios de desenvolvimento da soja, durante a infestação da folha com lagarta *A. gemmatalis* e da infecção da raiz com o nematoide de galha *M. incógnita*. Para a infecção da folha foram identificados os genes GmCYP2 e GmELF1- α , para a infecção da raiz pelo nematoide foi identificado GmELF1- α e GmTUA5, como os genes de referência mais estáveis (MIRANDA et al., 2013). Na validação de genes de referência para soja em estresse hídrico foram identificadas como as mais estáveis os genes β -actina e RNAr18S em folhas e raízes (STOLFMOREIRA et al., 2011). E para plantas de soja sob condições de hipóxia foram identificados os genes ELF1- β e β -actina (NAKAYAMA et al., 2014).

Em berinjela foram identificados os genes RNAr18S, APRT (adenina fosforibosil transferase) e CYP como os mais estáveis, quando analisados 4 variedades diferentes, folhas de plantas transgênicas e sob o estresse biótico, do nematoide *M. incógnita* (GANTASALA et al., 2013). Em pepinos foram identificados os genes ELF1- α e UBI-ep como os mais estáveis para todas as condições estudadas: calor e frio, estresse hídrico e salinidade, diferença hormonal e diferentes tecidos (WAN et al., 2010). E em estudos com tomates sob estresse de fotoperíodo os normalizadores identificados foram o GAPDH e o PGK (fosfoglicerato quinase),

nas condição de estresse de frio e nitrogênio o estável foi o ELF1- α (LØVDAL; LILLO, 2009).

REFERÊNCIA

AARROUF, J. et al. Agrobacterium rhizogenes-dependent production of transformed roots from foliar explants of pepper (*Capsicum annuum*): a new and efficient tool for functional analysis of genes. **Plant cell reports**, v. 31, n. 2, p. 391–401, fev. 2012.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. **SOJA – Doença Radiculares e de Hastes e Inter-relações com o Manejo do Solo e da Cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010.

ALPIZAR, E. et al. Efficient production of Agrobacterium rhizogenes-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant cell reports**, v. 25, n. 9, p. 959–67, set. 2006.

ALPIZAR, E. et al. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of botany**, v. 101, n. 7, p. 929–40, maio 2008.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer research**, n. 64, p. 5245–5250, 2004.

ANDRADE, S. R. M. DE. Transformação de plantas. **Embrapa Cerrados. Documentos**, p. 27, 2003.

ARAUJO, F. F. DE; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. CONTROLE GENÉTICO, QUÍMICO E BIOLÓGICO DE MELOIDOGINOSE NA CULTURA DA SOJA. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 220–224, 2012.

BAKHETIA, M. et al. RNA interference and plant parasitic nematodes. **Trends in plant science**, v. 10, n. 8, p. 362–7, ago. 2005.

BALASUBRAMANIAN, A. et al. Optimisation of methods for Agrobacterium rhizogenes mediated generation of composite plants in *Eucalyptus camaldulensis*. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 7, p. O45, 2011.

BARCALA, M. et al. Early transcriptomic events in microdissected Arabidopsis nematode-induced giant cells. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 61, n. 4, p. 698–712, fev. 2010.

BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as Agrobactérias. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, p. 15–27, 2004.

- BIRD, D. M.; OPPERMAN, C. H.; DAVIES, K. G. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 11, p. 1269–1276, set. 2003.
- BONATO, E. R. **Estresses em soja**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000. p. 254
- BORGES, A.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant cell reports**, v. 31, n. 5, p. 827–38, maio 2012.
- BOSELUT, N. et al. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Prunus as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. **Plant cell reports**, v. 30, n. 7, p. 1313–26, jul. 2011.
- BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Agrobacterium: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, p. 12–15, 2002.
- BUSTIN, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 1 out. 2000.
- BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, n. 29, p. 23–39, 2002.
- CHABAUD, M. et al. Agrobacterium rhizogenes -mediated root transformation. **Medicago truncatula handbook**, n. November, p. 1–8, 2006.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento - Jul. p. 1–29, 2012.
- CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira - Grãos - safra 2013/2014 - Segundo Levantamento - Novembro 2013. **Boletim de Monitoramento Agrícola**, v. 1, n. 2, novembro, p. 1–66, 2013.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira - Segundo Levantamento - SAFRA 2014/15. **Boletim de Monitoramento Agrícola**, v. 2, n. 2, Novembro 2014, p. 98, 2014.
- DEKKERS, B. J. W. et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in Arabidopsis and tomato seeds. **Plant & cell physiology**, v. 53, n. 1, p. 28–37, jan. 2012.
- DIAS, W. P. et al. Nematóides em soja: identificação e controle. **Embrapa Soja. Circular Técnica.**, n. 76, p. 1–8, 2010.
- EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja - Paraná 2005 (Sistemas de Produção 5). **Embrapa Soja**, p. 224, 2004.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013. **Embrapa Soja**, 2011.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014 - Sistema de Produção / 16**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2013. p. 265

FERRAZ, L. C. B. C. **As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

FUGANTI, R. et al. 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.

GANTASALA, N. P. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies by real-time PCR in eggplant (*Solanum melongena* L.). **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 312, jan. 2013.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual review of phytopathology**, v. 40, p. 191–219, jan. 2002.

GUÉNIN, S. et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 2, p. 487–93, jan. 2009.

GUIMARÃES, T. A.; ALVAREZ, V. M. P. Análise do processo de difusão tecnológica de cultivares de soja da Embrapa no Paraná. **Revista de Política Agrícola**, n. 3, p. 19–34, 2011.

HOMRICH, M. S. et al. Soybean genetic transformation: a valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 998–1010, 2012.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC molecular biology**, v. 10, p. 93, jan. 2009.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–84, jun. 2005.

IBRAHIM, H. M. M. et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 90–9, jan. 2011.

LE, D. T. et al. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e46487, jan. 2012.

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, J.-F. et al. The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. **Plant methods**, v. 5, n. 6, p. 1–15, jan. 2009.
- LIBAULT, M. et al. Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. **The Plant Genome Journal**, v. 1, n. 1, p. 44, 2008.
- LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. **Analytical biochemistry**, v. 302, n. 1, p. 52–9, 1 mar. 2002.
- LØVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. **Analytical biochemistry**, v. 387, n. 2, p. 238–42, 15 abr. 2009.
- MANKIN, S. L. et al. Disarming and sequencing of Agrobacterium rhizogenes strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 6, p. 521–535, 19 set. 2007.
- 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.
- MENDES, M. DE L.; RODRIGUEZ, P. B. N. Reação de Cultivares de Soja [Glycine max (L.) Merrill] aos Nematóides de Galhas Meloidogyne javanica e M. incognita Raças 1, 2, 3 e 4. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 211–217, 2000.
- MIRANDA, V. D. J. et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC research notes**, v. 6, p. 196, jan. 2013.
- MULLER, P. Y. et al. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. **BioTechniques**, v. 32, n. 6, 2002.
- NAKAYAMA, T. J. et al. Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 860–871, 2014.
- PARKINSON, J. et al. A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. **Nature genetics**, v. 36, n. 12, p. 1259–67, dez. 2004.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 6, p. 509–15, mar. 2004.

PIRIAN, K.; PIRI, K.; GHIYASVAND, T. Hairy roots induction from *Portulaca oleracea* using *Agrobacterium rhizogenes* to Noradrenaline's production. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**, v. 3, n. 3, p. 642–649, 2012.

REBOUÇAS, E. DE L. et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 143–154, 2013.

REECE, R. J. **Analysis of genes and genomes**. Chichester, England: John Wiley&Sons Ltd, 2004. p. 469

ROYCHOWDHURY, D.; MAJUMDER, A.; JHA, S. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. In: CHANDRA, S.; LATA, H.; VARMA, A. (Eds.). . **Biotechnology for Medicinal Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

SANFORD, J. C. et al. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, v. 5, p. 27–37, 1987.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista da Ciência & Tecnologia**, v. 15, p. 81–90, 2000.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861–871, 2008.

SAVKA, M. et al. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, v. 80, n. 5, p. 503–508, 1990.

SCHMITTGEN, T. D. et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Analytical biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 194–204, 15 out. 2000.

SCHMITTGEN, T.; ZAKRAJSEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 46, p. 69–81, 2000.

SILVA, J. F. V. et al. Identificação de Marcadores Moleculares de Microssatélites Associados a Resistência de Genótipos de Soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 79–83, 2001.

SILVA, J.; FERRAZ, L.; ARIAS, C. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. **Nematropica**, 2001.

SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 7, n. 33, jan. 2006.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 58–65, 2011.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 291–295, out. 1999.

USDA. World Agricultural Supply and Demand Estimates. n. Novembro, 2014.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

VARSHNEY, R. K. et al. Orphan legume crops enter the genomics era! **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 202–10, abr. 2009.

VEENA, V.; TAYLOR, C. G. Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 5, p. 383–403, 16 nov. 2007.

VERDEJO, S.; JAFFEE, B. A; MANKAU, R. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on Plant Roots Genetically Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of nematology**, v. 20, n. 4, p. 599–604, out. 1988.

VIDAL, M. S.; CARVALHO, J. M. C. Regeneração e Transformação Genética de Plantas. **Embrapa Algodão. Circular Técnica.**, n. 64, p. 1–8, 2002.

VOINNET, O. et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 33, n. 5, p. 949–56, mar. 2003.

WAN, H. et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical biochemistry**, v. 399, n. 2, p. 257–61, 15 abr. 2010.

WEBER, R. L. M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1070–1075, 2011.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 327–333, ago. 2003.

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, R. S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1735–45, out. 1996.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in genetics : TIG**, v. 22, n. 7, p. 396–403, jul. 2006.

YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. **Scientia Horticulturae**, v. 96, n. 1-4, p. 81–90, dez. 2002.

2. CAPITULO 2 - ARTIGO 1: OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA POR *Agrobacterium rhizogenes* PARA BIOENSAIOS COM NEMATOIDES.

KUMA, Kátia Miki. **Otimização do Método de Transformação de Raízes de Soja por *Agrobacterium rhizogenes* para bioensaios com nematoides.** 2014. --fs. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

RESUMO

Os métodos aplicados à análise funcional de genes são de fundamental importância na validação de resultados obtidos de estudos *in silico* e/ou de prospecção gênica. Os métodos de transformação genética para a obtenção de tecidos com expressão transiente e de rápidos resultados são os de maior interesse. Dessa forma, a transformação via *A. rhizogenes* torna-se um método rápido para a obtenção de plantas contendo raízes transformadas, além de se mostrar eficiente em estudos de superexpressão e/ou silenciamento de genes relacionados a estresses causados por fitopatógenos de raízes. Alguns protocolos têm sido adaptados em soja, mas há limitações na eficiência de transformação, levando a um reduzido número de plantas em bom estado para a condução de bioensaios com nematoides. Neste trabalho, o método de transformação de raízes de soja com *A. rhizogenes* foi otimizado permitindo uma elevação significativa na eficiência na transformação e recuperação de plantas transformadas, visando sua aplicação em estudos envolvendo a interação da soja com nematoides. Após a adição de uma etapa de recuperação via hidroponia e alteração no processo de seleção com a retirada do antibiótico higromicina, foi obtida uma taxa de 55% de eficiência de transformação.

Palavras-chave: Transformação transiente, raízes transgênicas, plantas compostas de soja, bioensaios.

KUMA, Kátia Miki. **Method Optimization of Soybean Roots Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* for nematode bioassays.** 2014. --fs. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

ABSTRACT

Applied methods to functional analysis of genes are critical for validation of results obtained from in silico studies and/or by gene prospecting. Methods of genetic transformation to obtain transient expression tissues and rapid results are the major interest. Thus, the transformation through *A. rhizogenes* becomes an extremely fast method for obtaining transgenic roots; in addition it is efficient to overexpression genes related to stresses caused by root's phytopathogens. Some protocols have been adapted, but there are limitations on the transformation efficiency, causing a reduction on the amount of plants in good condition obtained for conducting bioassays with nematodes. In this work the method of transformation of soybean roots with *A. rhizogenes* was optimized allowing a significant increase in efficiency in the processing and recovery of transformed plants, for their application in studies involving the interaction of soybean and nematodes. After addition of a recovery step by hydroponic and changing the selection process with the exclusion of hygromycin antibiotic a rate of 55% transformation efficiency was obtained.

Key-words: Transient transformation, transgenic roots, soybean composite plants, bioassays.

2.1. INTRODUÇÃO

Fatores bióticos e abióticos afetam as culturas agrícolas, como a soja, de forma a interferir na qualidade e produtividade dos grãos (BONATO, 2000). Dentre os fatores bióticos, as doenças causadas por nematoides estão entre as mais prejudiciais à cultura da soja, no Brasil. As principais espécies de fitonematoides encontradas no Brasil são as formadoras de galhas (*Meloidogyne spp.*), de cisto (*Heterodera glycines*), de lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (DIAS et al., 2010).

Os nematoides são organismos muito abundantes e ocupam diversos nichos ecológicos, sendo a maioria de vida livre. Alguns podem parasitar animais, como o homem, e plantas, causando doenças e prejuízos na agricultura. Os fitonematoides podem infectar inúmeras culturas em todo o mundo, sendo considerados parasitas economicamente importantes (PARKINSON et al., 2004; WILLIAMSON; KUMAR, 2006; YAMAMOTO; HAYASHI, 2002; YOUSSEF et al., 2013), afetando a produção de culturas como milho, cevada, aveia, arroz, batata, trigo e soja (NICOL et al., 2011). Na cultura da soja as perdas devido a este parasita pode variar de leves até o comprometimento de toda a produção (MENDES; RODRIGUEZ, 2000).

Com a revolução nas técnicas de sequenciamento em larga escala, a quantidade de genomas e dados de transcriptoma disponíveis se eleva rapidamente. A validação funcional ou genômica funcional se caracteriza como uma etapa crucial na Era Genômica para desvendar a função de genes e na compreensão das redes gênicas ativadas e/ou reprimidas em respostas aos mais variados tipos de fatores.

Estratégias para o estudo funcional de genes que envolvam metodologias de transformação estável são morosas e de elevado custo, de modo que não são capazes de atender a crescente disponibilidade de dados gerados pelos sequenciamentos, principalmente em espécies recalcitrantes ou de difícil transformação como a soja. Desse modo, métodos de transformação transiente ganham destaque, pois além da rapidez, permitem uma análise em larga escala (LI et al., 2009). Trata-se de um sistema útil por ser rápido, flexível, não ser afetado pela posição cromossomal, com a possibilidade de utilização em tecidos diferenciados de plantas, além de ser considerado um método seguro, uma vez que o transgene não é transmitido para a prole (VOINNET et al., 2003).

A transformação via *Agrobacterium* utiliza a capacidade desta bactéria de transferir fragmentos de DNA externo para as células das plantas sem danificar a parede celular da mesma (LI et al., 2009), utilizando o DNA de transferência (T-DNA). A *Agrobacterium rhizogenes* infecta dicotiledôneas, induzindo a proliferação de raízes no local da infecção. A partir desta técnica é possível produzir raízes contendo e expressando o gene de interesse, de forma rápida e eficiente (ALPIZAR et al., 2006), pois é capaz de gerar plantas compostas em que as raízes adventícias são transformadas com o transgene e o restante da planta não (WEBER; BODANESE-ZANETTINI, 2011).

A validação de genes, bem como a prospecção de promotores raiz-específicos vem sendo conduzidas com sucesso pelo uso da transformação transiente mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (KANDOTH et al., 2011; MELITO et al., 2010). A metodologia vem sendo ainda utilizada para a produção de metabólitos secundários usados comercialmente, estudos de genes envolvidos na nodulação, na morfologia e no desenvolvimento de plantas e na resistência a patógenos específicos de raiz, como os nematoides (ALPIZAR et al., 2008). Com isso, algumas pesquisas estão voltadas para a otimização desta técnica em diferentes culturas como *Coffea arabica* (ALPIZAR et al., 2006), plantas do gênero *Prunus* (BOSELUT et al., 2011), e soja (LI; TODD; TRICK, 2010).

Métodos utilizados para a transformação de soja em que a agro-infiltração (infiltração das células de *A. rhizogenes*) ocorre pela utilização de vácuo (ALZOHAIRY; MACDONALD; MATTHEWS, 2013) ou apenas pelo contato constante com uma lesão presente no caule (COLLIER et al., 2005), apresentaram alta eficiência de transformação. No trabalho de Collier et al. (2005), a transformação de raízes em plantas de soja apresentou eficiência de 80 a 90%, uma vez que todas as plantas que apresentaram pelo menos uma raiz transformada foi considerada, nessas plantas apenas 50% das raízes eram transformadas. No trabalho de Alzohairy, MacDonald e Matthews (2013) foi verificado um rendimento de 65 a 70% de plantas transformadas após aproximadamente 40 dias. Um outro trabalho que utilizou a transformação de raízes de soja por agro-infiltração foi o de Ibrahim et al. (2011), que apresentou uma eficiência de 60% de transformação, neste trabalho foi realizado a seleção das raízes transformadas (as raízes não transformadas foram excisadas) por duas vezes e após, aproximadamente, 9 semanas as plantas compostas apresentaram raízes suficientes para serem utilizadas em experimentos

com nematoides. Portanto, Um dos fatores limitantes do emprego da metodologia para validação de genes em raízes de soja é o tempo necessário para se obter as plantas compostas em condições de serem utilizadas em bioensaios.

Outro fator é a baixa eficiência dos métodos, como o proposto por Li, Todd e Trick (2010), na qual a agro-infiltração ocorre pela inserção da suspensão das células de *A. rhizogenes* via seringa e a eficiência não ultrapassou 23,3%, mas o tempo para a obtenção das plantas compostas é de apenas 30 dias. Lin et al. (2011) utilizando este mesmo método de transformação obteve um rendimento de apenas 19% após 18 dias de transformação e 34% após 60 dias.

Com isso, o objetivo desse trabalho foi aperfeiçoar a metodologia de transformação por *Agrobacterium rhizogenes* em soja, visando maior eficiência de transformação e recuperação de plantas no menor tempo possível, com foco em estudos funcionais em resposta a nematoides.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para a padronização do método de transformação de raízes de soja por *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599) foi utilizada a cultivar Williams 82, genótipo modelo amplamente utilizado em estudos genéticos, e tendo como base o procedimento descrito por Li, Todd e Trick (2010).

Na etapa inicial, células de *Agrobacterium rhizogenes* foram transformadas por eletroporação com o vetor binário pH7WG2D (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002), compatível com o sistema "Gateway". Esse vetor apresenta o gene *Egfp*, um gene marcador que codifica uma proteína de fluorescência verde (GFP - *green-fluorescent protein*) sob regulação do promotor *rolD* e ligado a um sinalizador alvo do retículo endoplasmático, além de genes de resistência aos antibióticos espectinomicina, estreptomicina e higromicina. Além disso, o vetor possui no sítio de clonagem o promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor, que é altamente ativo em plantas.

2.2.2. TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium rhizogenes*

O material para as transformações de *Agrobacterium rhizogenes* k599 foram oriundos de extrações plasmidiais dos clones recombinantes contendo o vetor pH7WG2D utilizando o Kit *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification* da Invitrogen. A eletroporação foi realizada com o eletroporador *MicroPulser (Bio-Rad)* com o programa AgR, preparado para 2,2kV, 25µF, com controlador de 1 pulso para 200 ou 400ohms. Utilizou-se 60ng do produto da reação de ligação (vetor pH7WG2D) e 40µL de células eletrocompetentes de *A. rhizogenes*. A recuperação das células foi realizada em uma suspensão de bactérias em 1mL de meio YEP líquido (sem antibiótico), em tubo *Falcon* de 15mL estéril, e foram incubadas a 28°C, por 2h sob agitação de 200rpm. Após este período, 100µL de células eletroporadas foram plaqueadas, em meio YEP sólido contendo 100µg/mL de Espectinomicina (resistência da *A. rhizogenes*), 100µg/mL de Higromicina (resistência do vetor de destino). E as placas foram incubadas a 28°C durante a noite.

Após a transformação, uma colônia foi selecionada para a realização da lise alcalina. O material da lise alcalina foi utilizada para a reação de confirmação da transformação da *A. rhizogenes* com o vetor por PCR (clones recombinantes), utilizando o conjunto de iniciadores específicos para o vetor de destino pH7WG2D (*Forward* – 5' GCGGGGTCATAACGTGACT 3'; *Reverse* – 5' CGCACAATCCCACTATCCTT 3').

2.2.3. TRANSFORMAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA POR *Agrobacterium rhizogenes*

Sementes da cultivar Williams 82 foram esterilizadas (etanol 70% por 10 minutos, depois imersas em solução de hipoclorito 1% por 20 minutos e lavadas com água destilada três vezes). Logo após, foram colocadas em meio ½ MS sólido [8g/L de ágar, ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina GamborgB5, 1,90g/LMES, pH5,7] para a germinação (adaptada de Li, Todd e Trick (2010)). A vitamina Gamborg B5 foi filtroesterelizada e adicionada ao meio de cultura após a esterilização deste meio.

Para preparo do inóculo, uma colônia de clones recombinantes de *A. rhizogenes* foi inoculada em 500mL em meio YEP (10g/L de peptona bacteriológica, 5g/L de extrato de levedura e 5g/L de NaCl, com ajuste do pH para 7,0) contendo os

antibióticos espectinomicina e higromicina com concentração 100µg/mL, sob agitação a 150rpm, a 28°C por 24h. Após este tempo a solução foi centrifugada a 3286g por 3 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado formado foi delicadamente ressuspendido em 8mL de água Milli Q.

As transformações foram realizadas em três repetições, com 100 plântulas cada e utilizando sementes com 4 e 5 dias de desenvolvimento após a germinação, totalizando 600 plântulas.

Inicialmente foi removida a radícula, com um corte na região de separação entre o hipocótilo e a radícula. Logo depois, as plântulas de soja foram inoculadas com 0,1mL de células de *A. rhizogenes* (inóculo) na região do hipocótilo, através de três injeções (utilizou-se seringa de 1mL) paralelamente ao feixe vascular. As plântulas inoculadas foram transferidas para o meio de co-cultivo sólido [6g/L de ágar, ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina Gamborg B5, 1,90g/L MES, 1mL/L Dithiothreitol [1M] e Tiosulfato de sódio [1M], pH 7,0) (Figura 1).

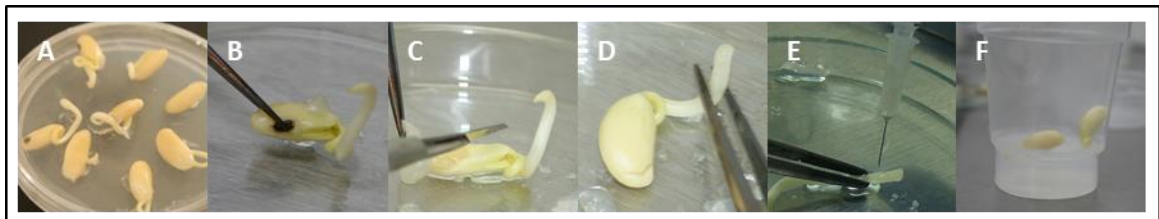


Figura 1: Sequência das etapas da transformação de raízes de soja com *A. rhizogenes*. A e B) Sementes com 4 e 5 dias de germinação. C e D) Excisão da radícula dos embriões a serem transformados. E) Inoculação das bactérias recombinantes nos embriões via injeção, de forma paralela ao feixe vascular. F) Plantas em meio de co-cultivo.

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; utilizou-se sementes germinadas entre 4 e 5 dias sendo injetada apenas água.

2.2.4. SELEÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS

Após sete dias de co-cultivo, as plantas foram transferidas para o meio de seleção [8g/L de ágar, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina Gamborg B5, 1,90 g/L MES, pH5,7] contendo 100µg/mL de cefotaxime e 15µg/mL de higromicina, onde foram mantidas por 10 dias.

Paralelamente à seleção com o auxílio de antibióticos, as raízes transformadas foram também inspecionadas e selecionadas com base 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 100W de alta pressão e vapor de mercúrio, e dois conjuntos de filtros para *Egfp* (470/40 nm).

2.2.5. ACLIMATAÇÃO VIA HIDROPONIA

Após a seleção, as plântulas compostas foram transplantadas para uma etapa adicional de hidroponia, por aproximadamente 10 dias, visando a recuperação do sistema radicular (Figura 2). 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 (606,6mg/L KNO_3 , 944,6mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 230,06mg/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 492,96mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,724mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,86mg/L H_3BO_3 , 0,017mg/L MoO_3 , 0,22mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 4,47mg/L Fe EDTA) utilizada. Todo sistema foi mantido em ambiente com temperatura controlada de $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade de $90\% \pm 10\%$.

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 compostas foram transferidas para tubetes contendo areia e cultivadas em casa de vegetação.

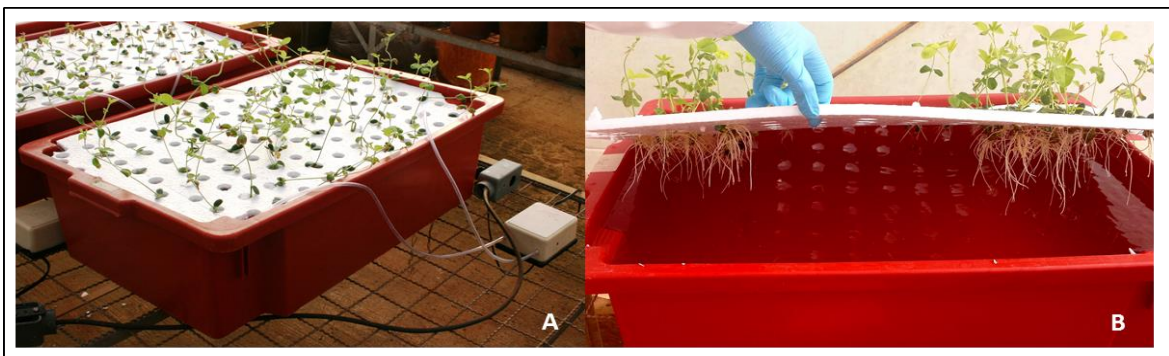


Figura 2: Sistema de hidroponia. A) Sistema de hidroponia montado. B) Bandeja contendo solução nutritiva e disposição das plantas no suporte.

2.2.6. EFEITO DA HIGROMICINA NAS PLANTAS TRANSFORMADAS

Um novo teste foi realizado com o intuito de avaliar a influência do antibiótico higromicina no desenvolvimento das plantas e, principalmente, na seleção das raízes transformadas. Para este experimento, foram utilizadas 114 sementes, germinadas por 5 dias. Após a transformação e a etapa de co-cultivo, metade do número de plantas foram submetidas ao meio de seleção contendo apenas cefotaxime (100µg/mL) e a outra metade em meio contendo, além da cefotaxime, higromicina, na concentração de 15µg/mL, um antibiótico normalmente utilizado para seleção em protocolos de transformação por *A. rhizogenes* (Figura 3).



Figura 3. Plantas em meio de seleção. A) Plantas em meio de seleção contendo higromicina. B) Plantas em meio de seleção sem higromicina.

Após o período no meio de seleção, as plantas de ambos os tratamentos passaram pela seleção baseado na observação visual da expressão da proteína *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. Depois desta seleção as plantas foram transferidas para o sistema de hidroponia, e, após a recuperação, as raízes transformadas foram novamente inspecionadas via observação visual da expressão da proteína *Egfp* em microscópio, para verificar se apareceram escapes. Paralelamente, o número final de plantas recuperadas em cada tratamento foi

contabilizado e a eficiência de transformação calculada (número de plantas com raízes transformadas em relação ao número de plantas totais). Das plantas recuperadas, foi avaliado o número de folhas e altura; a área da raiz foi determinada utilizando o programa Adobe® Photoshop® CS6 versão 13.0 x32.

As medidas dos parâmetros avaliados foram submetidas ao programa Statistica 7.0 para se detectar os “*outliers*”. As médias entre os parâmetros avaliados em cada tratamento foram avaliadas pelo Teste t, com o nível de confiança de 5%.

2.2.7. CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DAS RAÍZES

Além da inspeção visual de GFP, a confirmação da ocorrência das raízes transgênicas foi avaliada via PCR. A raiz foi utilizada para extração de DNA e posteriormente as amostras foram amplificadas via PCR como conjunto de iniciadores específicos para o promotor 35S (*Forward* – 5' GATATCACTAGTGCGGCCG 3' e *Reverse* – 5' ACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTT 3').

O DNA genômico foi extraído utilizando 50mg do tecido com 300µL do tampão (DOYLE; DOYLE, 1987) (2% CTAB, 2% PVPP, 100mM Tris-Cl 1M pH8,0, 25mM de EDTA 0,5M pH8,0, 2M de NaCl), e após homogeneizar em vortex, a amostra foi incubada 65°C por 30 minutos, seguido da adição de 300µL de clorofórmio e leve agitação por inversão. Posteriormente a solução foi centrifugada e o sobrenadante transferido e adicionado 200µL de isopropanol (2-propanol) gelado para a precipitação do DNA durante 30 minutos a -20°C. A amostra foi centrifugada por 5 minutos, a 16000g e uma nova centrifugação com etanol 70% foi realizada para lavagem do precipitado. O mesmo foi ressuscitado em tampão TE (Tris-HCl 1M pH 8,0 e EDTA 0,5M pH 8,0).

O mix da PCR continha 1µL [100ng] de DNA, 2,5µL de tampão [10x], 1µL de MgCl₂ a [25mM], 1µL de dNTPs Mix a [2,5mM], 1µL de iniciadores, *forward* e *reverse*, a [10µM], e 0,2µL Taq DNA Polimerase [5U/µL] em um volume final de 25µL. As ciclagens da PCR foram, 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C, o anelamento por 45 segundos a 62°C e a extensão por 45 segundos a 72°C. No final, utilizou-se uma etapa de 5 minutos a

72°C de extensão. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de eletroforese, preparado com agarose 1%, tampão SB 1x e corado com 1µL/10mL de brometo de etídio (10mg/mL). Para a aquisição e armazenamento das imagens foi utilizado o equipamento transluminador e fotodocumentador *Loccus*.

2.2.8. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *EGFP* NAS RAÍZES

Para verificar a estabilidade da transformação de raízes de soja mediada por *A. rhizogenes* ao longo do tempo, as raízes foram reavaliadas quanto a expressão de *Egfp* após 45 dias mantidas em casa de vegetação em tubetes contendo areia, via inspeção visual da expressão da proteína GFP (*Egfp*) em microscópio de fluorescência Leica MZIII (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), os filtros empregados para a detecção de *Egfp* apresentam um módulo de fluorescência que contém uma lâmpada Leica 106Z de 50 ou 100W de alta pressão e vapor de mercúrio, e dois conjuntos de filtros para *Egfp* (470/40 nm). Além disso, foi verificada a expressão do GFP via RT-qPCR.

A extração do RNA total das raízes transformadas foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as soluções e utensílios para os procedimentos foram preparadas e tratados com água DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada, que atua inativando RNAses através da degradação dos resíduos de histidina presentes na enzima. Adicionou-se 1mL de reagente Trizol para cada 100mg de tecido e a amostra foi homogeneizada em vortex por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol e agitou-se vigorosamente por 15 segundos e foi deixado em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. O clorofórmio adicionado ao tampão contendo RNA solubiliza os lipídios da membrana celular e nuclear, removendo-os uma vez que a fase aquosa e orgânica são separadas. Foi realizada a centrifugação a 18000g por 15 minutos a 4°C. E a fase líquida foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se 500µL de isopropanol para cada mL de Trizol utilizado anteriormente para precipitar o RNA. Depois, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e foi realizada nova centrifugação a 18000g por 10 minutos a 4°C, para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com

etanol 75%. O etanol foi removido por centrifugação a 14000g por 5 minutos a 4°C e o precipitado ressuspenso em 50µL de água tratada com DEPC autoclavada.

A concentração de RNA total das amostras foi determinada em espectrofotômetro (nanodrop) a 260nm e a integridade visualizada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (EtBr), em tampão SB 1X. Após a extração, todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C.

Após a extração do RNA total foi realizado o tratamento das amostras com a enzima Desoxiribonuclease I (Kit *Invitrogen* - DNase I), para eliminar moléculas de DNA presentes nas amostras. O produto deste tratamento foi utilizado para a síntese de cDNA. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit *SuperScript III* da *Invitrogen*, conforme orientação do fabricante.

Para análise de expressão do gene *Egfp* nas raízes transformadas por RT-qPCR foi utilizada a metodologia SYBR green. Como normalizadores foram utilizados os genes *GmELF1α* (*Elongation Factor 1-α*) e *GmTUA* (alfa tubulina), pois demonstraram ser mais estáveis em análises em raízes de soja, conforme Miranda et al. (2013). A eficiência da reação de amplificação para cada par de iniciadores do gene estudado (*Egfp*: *Forward* – 5' TGACCCTGAAGTTCATCTGC3' e *Reverse* – 5' AAGTCGTGCTGCTTCATGTG 3') e dos normalizadores (*GmELF1α*: *Forward* – 5' GACCTTCTTCGTTTGTGCGCA3' e *Reverse* – 5' CGAACCTCTCAATCACACGC 3'; *GmTUA*: *Forward* – 5' AGGTCGGAAACTCCTGCTGG3' e *Reverse* – 5' AAGGTGTTGAAGGCGTCGTG 3') foram estimada através de uma série de diluições do cDNA (5⁰ a 5⁻⁴), em duplicata.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador ABI PRISM® 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) utilizando o kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (*Invitrogen*). Na reação de quantificação relativa foi adicionada 6,25 µL de *SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (composto *Platinum® Taq DNA polymerase*, fluoróforo *SYBR Green I dye*, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, dGTP, dATP, dCTP, dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e 0,1µM de fluoróforo ROX), 0,2µM de cada iniciador R e F, 1µL de cDNA na concentração 10⁻¹ e água Milli Q para um volume final de 12,5µL.

As ciclagens utilizadas nas reações foram: 95°C por 10 minutos (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (pareamento) e a 60°C por 1 minuto (extensão), os dados foram coletados nesta

etapa. Depois foi conduzida uma etapa de desnaturação lenta, com elevação da temperatura de 1°C/minuto, para a construção da curva de dissociação e verificação de possível amplificação inespecífica. Os valores de Ct obtidos foram plotados em função do logaritmo das diluições, e o índice de inclinação da reta formada foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema de acordo com a fórmula $E = [5^{-1/\text{slope}}]^{-1}$.

A quantificação relativa, para o gene *Egfp* no tratamento analisado, foi realizada utilizando triplicatas técnicas de cada uma das três repetições biológicas. Os valores de Ct das raízes transformadas foram comparadas com as das raízes controle (não transformadas), sendo os níveis de expressão do gene alvo e sua significância estatística estimados utilizando o programa REST2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a otimização do protocolo de transformação transiente de raízes de soja via *A. rhizogenes*, produzindo plantas compostas em 30 dias, com a inserção da etapa de aclimatação por hidroponia e a retirada da seleção das raízes transformadas via antibiótico higromicina, e com alta eficiência de transformação, com uma média de, aproximadamente, 55%, sendo que todas as plantas se apresentaram viáveis para bioensaios com nematoides. Tal eficiência é expressivamente superior ao trabalho de Li, Todd e Trick (2010), em que a eficiência média não ultrapassa 23,3% e 34% de Lin et al., (2011), cuja metodologia de agro-infiltração é a mesma. E o tempo necessário é menor do que nos trabalhos de Alzohairy, Macdonald e Matthews (2013), que utilizaram 40 dias obter plantas com raízes transgênicas e de Ibrahim et al. (2011) que obteve plantas compostas para bioensaio com nematoides em 9 semanas.

2.3.1. EFICIÊNCIA NA RECUPERAÇÃO DAS PLANTAS TRANSFORMADAS

O número de plantas obtidas em cada etapa foi utilizado para estimar os rendimentos da metodologia de transformação de raízes de soja por *A. rhizogenes*.

Na etapa de germinação, houve uma redução no número inicial de sementes utilizadas, sendo recuperadas 77,7% e 83,0% de plântulas após 4 e 5 dias de germinação, respectivamente.

O tempo de germinação não influenciou a eficiência de transformação, não sendo detectada diferença no número de plantas transformadas quando comparado os dois períodos de germinação (4 e 5 dias). Contudo, foi observado um menor rendimento de embriões para a transformação, quando esses foram agro-infiltrados com 4 dias de germinação. O rápido desenvolvimento de embriões de soja, principalmente quando mantidos em meio de cultura, torna importante a diferença de 1 dia para a agro-infiltração, e por isso os embriões oriundos de sementes germinadas por 4 dias apresentaram hipocótilo muito frágil para o procedimento. O resultado obtido por Li, Todd e Trick (2010) foi diferente, uma vez que conseguiram uma melhor taxa de transformação com sementes germinadas por 4 dias (23,3%) à 5 dias (18,5%). Esta diferença pode ser resultado da utilização das variedades de soja Jack e KS4704, diferentes das utilizadas neste trabalho, bem como das cepas de *Agrobacterium rhizogenes* R1000 e K599. É sabido que o “background” genético dos diferentes genótipos de soja tem grande influência na eficiência de transformação (WEBER; BODANESE-ZANETTINI, 2011).

Uma etapa importante conduzida neste trabalho foi a retirada da radícula antes da agro-infiltração, na tentativa de minimizar os escapes de raízes não transformadas nesta região. Durante a padronização, observou-se que a forma de inoculação da bactéria, paralelamente ao feixe vascular do hipocótilo, pode influenciar significativamente a eficiência de transformação, uma vez que a aplicação da bactéria de forma superficial no tecido vegetal não promove uma transformação eficiente.

Após o período de co-cultivo das plantas transformadas, o rendimento de plantas viáveis foi de 90,2% (4 dias) e 95,7% (5 dias) (Tabela 1), essas foram transferidas para o meio de seleção, onde permaneceram por 10 dias.

Tabela 1. Eficiência da transformação de raízes de soja por *Agrobacterium rhizogenes*, a partir de sementes de soja com 4 e 5 dias de germinação.

Período de Germinação	Taxa de transferência para meio de seleção (%) ¹	Eficiência de transformação após a seleção (%) ²	Eficiência de transformação após a hidroponia (%) ³
4 dias	90,2	52,3	38,5
5 dias	95,7	50,0	41,1
Media	93,0	51,1	39,8

¹Quantidade de plantas transferidas para o meio de seleção em relação a quantidade de plantas transformadas.

²Quantidade de plantas que apresentaram raízes transformadas após etapa de seleção com o antibiótico higromicina, via observação visual da expressão da proteína GFP (*Egfp*) em microscópio, em relação a quantidade de plantas transformadas.

³Quantidade de plantas que apresentaram raízes transformadas após hidroponia em relação a quantidade de plantas transformadas.

Vários trabalhos que fizeram uso do método de transformação por infiltração de *A. rhizogenes*, empregaram a higromicina nas etapas de seleção das raízes transformadas pelo período de 2 a 4 semanas, para a eliminação e/ou inibição do aparecimento de raízes não transformadas, como os de Li, Todd e Trick (2010), produzindo uma planta composta de soja com a eficiência de 23,3%; Weber e Bodanese-Zanettini (2011), utilizaram a higromicina para selecionar as raízes transgênicas de soja produzidas *in vitro*; Venkatachalam, Lokesh e Bhagyalakshmi (2011), realizaram a transformação de embrião de banana utilizando o antibiótico para seleção dos explantes transformados; e Chattopadhyay et al.(2011), na transformação de *Corchorus capsularis L.*.

No presente trabalho foi evidenciado que a utilização da higromicina como uma forma de seleção não foi capaz de impedir a formação e/ou eliminar raízes não transgênicas de forma eficiente após um período de 10 dias de exposição. Tempos superiores de exposição não foram adotados, uma vez que a exposição mais prolongada de uma planta composta à higromicina, de 15 a 20 dias por exemplo, comprometeu a viabilidade das plantas, devido ao efeito que este antibiótico provoca nos tecidos não transformados.

2.3.2. SELEÇÃO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS VIA OBSERVAÇÃO DO *EGFP*

A detecção e eliminação de escapes após a etapa de seleção foi conduzida pelo método de excisão de raízes não transgênicas, através da observação da

fluorescência ao microscópio. As raízes transformadas apresentaram fluorescência facilmente observada sob o filtro do microscópio (Figura 4).

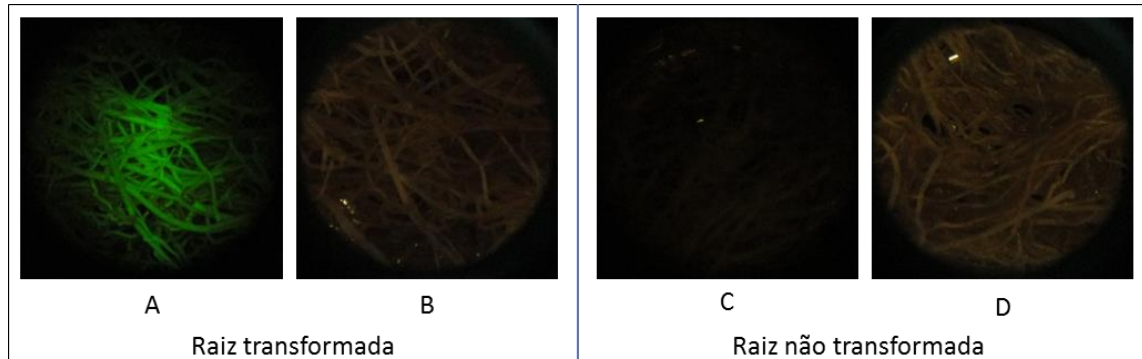


Figura 4. Perfil de expressão do *Egfp* em raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes*. A) Raiz transformada sob microscópio de fluorescência. B) Raiz transformada sob microscópio sem fluorescência. C) Raiz não transformada sob microscópio de fluorescência. D) Raiz não transformada sob microscópio sem fluorescência.

As raízes não transformadas foram fisicamente excisadas e as plantas que não apresentaram raízes transformadas foram descartadas. Dessa forma, foram transferidas para a etapa de aclimação via hidroponia somente plantas com raízes transformadas (Figura 4). Os rendimentos da etapa de seleção, em relação ao número inicial de plantas inoculadas, foram de 52,3% para 4 dias e 50,0% para 5 dias de germinação (Tabela 1).

A seleção das raízes não transformadas pela sua excisão causa estresse e muitas vezes a morte da planta. Isso ocorre, pois, com a retirada das raízes, a absorção dos nutrientes e da água, necessária para o desenvolvimento da planta, fica comprometida.

2.3.3. ETAPA DE ACLIMATAÇÃO – HIDROPONIA

Devido ao estresse provocado pelo uso de antibióticos presentes na etapa de seleção e pelo estresse decorrente da excisão das raízes não transformadas, uma etapa de aclimação foi inserida ao protocolo, onde as plantas foram mantidas em sistema de hidroponia por 10 dias. Após a etapa de hidroponia foram contabilizadas as plantas que possuíam raízes viáveis, ou seja, que poderiam ser conduzidas para experimentos de infecção por patógenos, como nematoides. Ao final do processo foi obtido um rendimento médio de 39,8% de plantas compostas (Tabela 1).

A etapa adicional de aclimação pela hidroponia possibilitou o acondicionamento das plantas em ambiente rico em nutrientes e umidade, e mostrou-se eficaz, uma vez que as raízes apresentaram o sistema radicular mais forte e vigoroso, ou seja, em condições ideais para empregá-las na instalação de experimentos com nematoides.

Após a etapa de aclimação via hidroponia, as raízes foram novamente avaliadas quanto a emissão de fluorescência por microscópio. As raízes transformadas continuaram expressando a fluorescência após esses período e, além disso, foi possível observar o efeito de recuperação pelo sistema de hidroponia. Tanto as raízes transformadas como as do controle, apresentavam-se visualmente mais vigorosas em relação à etapa anterior (Figura 5 e 6), algo não observado em plantas que foram diretamente transferidas para tubetes com areia após a seleção.



Figura 5. Diferença das raízes das plantas compostas e das não transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* após etapa de seleção. A) Plantas com raízes não transformadas. B) Plantas com raízes transformadas.



Figura 6. Diferença das raízes das plantas compostas e das não transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* após a aclimação na hidroponia. A) Plantas com raízes não transformadas. B) Plantas com raízes transformadas

2.3.4. CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DAS RAÍZES

A confirmação das raízes transformadas foi realizada utilizando o par de iniciadores específicos para o promotor 35S presente no vetor pH7WG2D. Os resultados da PCR foram positivos para as amostras de raízes transformadas (Figura 7).

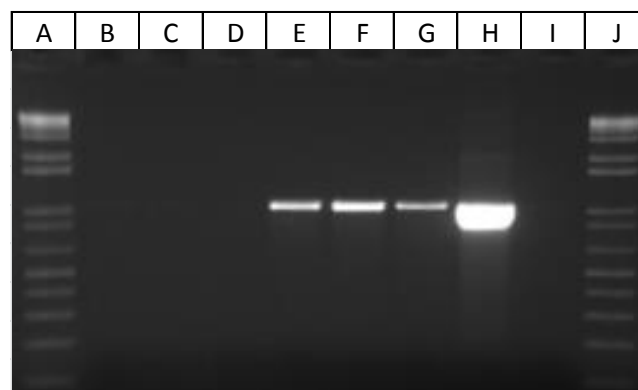


Figura 7. Gel de confirmação da transformação das raízes nas plantas compostas. Amplificação da região do promotor 35S que está presente no vetor utilizado pH7WG2D, portando não há amplificação nas raízes não transformadas. As raízes transformadas apresentaram banda de aproximadamente 1054pb, assim como o controle positivo que se refere somente ao vetor pH7WG2D. A e J) Ladder 1Kb plus. B, C e D) Raiz não transformada. E, F e G) Raiz transformada. H) Controle positivo. I) Controle negativo.

2.3.5. INFLUÊNCIA DA HIGROMICINA NA SELEÇÃO DAS RAÍZES TRANSFORMADAS

Em um segundo experimento, a interferência do antibiótico higromicina no desenvolvimento das plantas e na produção de raízes adventícias transformadas foi observada após as plantas passaram pela etapa de seleção, com meio contendo ou não o antibiótico higromicina. Sementes germinadas por cinco dias e seguindo todas as etapas de transformação previamente descritas, foram cultivadas por 10 dias em meio com e sem higromicina.

Plantas que estavam em presença da higromicina apresentaram comprometimento no desenvolvimento e poucas raízes transformadas, enquanto as plantas no meio de seleção sem a higromicina não apresentaram comprometimento no desenvolvimento e foi possível verificar mais raízes transformadas do que nas não transformadas ao microscópio. Essa diferença também foi evidente no cálculo de eficiência de transformação das plantas logo após o período de tempo no meio de seleção, uma vez que plantas no meio com higromicina apresentaram 45,0% de eficiência e as do meio sem higromicina, 57,5% (Tabela 2). Fica evidente que a utilização da higromicina na etapa de seleção não constitui um método adequado de seleção.

Os sinais de escurecimento dos tecidos são normalmente evidenciados apenas para as raízes não transformadas, porém também foram evidenciados no caule das plantas transgênicas (tecido que não foi transformado por *A. rhizogenes*). Aparentemente, esse sintoma pode ser causado pelo contato, inevitável, desse tecido não transformado com o meio de cultura contendo o antibiótico. Além disso, a absorção do antibiótico e sua translocação na planta parece ter contribuído para a fragilidade da parte aérea.

Os efeitos que a higromicina causa às células da planta que não apresentam o gene de resistência ao antibiótico deve-se essencialmente à sua ação de inibição na formação da cadeia de peptídeos, pois ela ocupa o sítio de ligação ribossomal 80S do fator de alongamento, o que significa que inibe a síntese proteica em eucariotos (EADY; LISTER, 1998; WILMINK; DONS, 1993). O principal efeito deste antibiótico nas plantas é a clorose e o branqueamento das folhas, pois causa o comprometimento ou inibição na síntese de clorofila. Tecidos resistentes a higromicina inativam-na por fosforilação de um grupo hidroxila, pois apresentam a enzima APH(4') ou higromicina fosfotransferase (HPT) (WILMINK; DONS, 1993).

Tabela 2. Interferência do antibiótico higromicina na eficiência de transformação de raízes de soja.

Meio de Seleção	Taxa de transferência para meio de seleção (%) ¹	Eficiência da transformação após a seleção (%) ²	Eficiência de transformação após a hidroponia (%) ³
Com higromicina	92,5	45,0	32,5
Sem higromicina	92,5	57,5	55,0

Em uma segunda seleção, realizada após o período de aclimação em hidroponia, foi possível verificar, além da diferença na eficiência de transformação, diferenças no desenvolvimento das plantas na presença e ausência da higromicina. As plantas que não foram expostas ao antibiótico higromicina apresentaram maior quantidade de folhas, maior altura da parte aérea e maior área de raiz quando comparadas às plantas que foram expostas à higromicina, sendo visivelmente mais vigorosas e potencialmente menos vulneráveis à transferência para areia para bioensaios com nematoides (Tabela 3; Figura 8).

Tabela 3. Efeito do antibiótico higromicina no desenvolvimento das plantas compostas de soja após a etapa de aclimação.

	Meio com Higromicina	Meio sem Higromicina	Valor p
Número de folhas	2,2	8,8	0,000033*
Parte aérea - altura (cm)	8,1	12,1	0,005363*
Área da raiz (cm ²)	4,1	7,4	0,031798*

*Diferença significativa considerando valores de $p \leq 0,05$ pelo Teste t.

Com a exclusão do emprego do antibiótico higromicina, seguida da recuperação das plantas via sistema de hidroponia, foi possível obter uma eficiência média de transformação de 55,0%, enquanto as plantas que ficaram em contato com o antibiótico este valor foi de 32,5% (Tabela 2).



Figura 8. Diferença entre o desenvolvimento das plantas e raízes de soja transformadas após aclimação por hidroponia. A) Plantas que permaneceram em meio de seleção contendo o antibiótico higromicina. B) Plantas que permaneceram em meio de seleção sem o antibiótico higromicina.

2.3.6. COMPARAÇÃO ENTRE RAÍZES TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS

Ao comparar plantas com as raízes transformadas e com raízes não transformadas, é possível verificar a diferença da coloração. A coloração marrom, presente nas raízes não transformadas, ocorre devido ao contato com o antibiótico higromicina do meio de seleção, uma vez que as raízes não transformadas não apresentam o gene de resistência ao antibiótico utilizado (Figura 5 e 6).

As plantas não transformadas apresentaram maior desenvolvimento de raízes adventícias, as quais aparecem em menor tempo do que as raízes induzidas pela *Agrobacterium*. Isso pode ocorrer, pois foi utilizada a cepa *K599* de *A. rhizogenes* que transfere menor número de plasmídeo em relação a outras cepas já descritas, limitando o crescimento e morfologia das raízes transformadas, para que seja possível fazer comparações com as raízes normais (CHABAUD et al., 2006).

A diferença de desenvolvimento verificada entre as plantas com raízes transformadas e as não transformadas ocorre devido ao T-DNA da *A. rhizogenes* transferido para o genoma vegetal. As *A. rhizogenes* são classificadas em sub-grupos, dependendo do tipo de opina sintetizada, como as agropinas, manopinas ou cucumopinas (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004; VEENA; TAYLOR, 2007). A cepa *k599* se enquadra nas que produzem a opina cucumopina (SAVKA et al., 1990) que apresentam apenas uma região de T-DNA. Esta única região de T-DNA possui apenas genes *rol* (*r*oot *l*ocus – locus de raiz), que são considerados responsáveis pela indução da formação das raízes. As cepas produtoras de cucumopinas apresentam apenas os genes *rolA*, *rolB* e *rolC*, não apresentando o gene *rolD* e os responsáveis pela produção de auxinas (VEENA; TAYLOR, 2007), diminuindo o desenvolvimento das raízes adventícias por esta cepa de *A. rhizogenes*.

Esses genes podem alterar o fenótipo da planta. Por exemplo, o gene *rolB* isolado é o mais eficiente na indução de formação de raízes, sendo responsável pela indução de raízes adventícias e em segmentos foliares cultivados *in vitro*. E o gene *rolA* é o que provoca maiores alterações morfológicas. Contudo, os genes *rol* atuam de forma sinérgica (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004), e quando presentes em

plantas inteiras transformadas geram características como entrenós curtos, folhas enrugadas, raízes com ampla ramificação lateral e também a formação de alguns metabólitos (BARROS; VIANA; CARNEIRO, 2004; MANKIN et al., 2007; ROYCHOWDHURY; MAJUMDER; JHA, 2013). Portanto, as diferenças no desenvolvimento e robustez das raízes das plantas transformadas e não transformadas, possivelmente, é devido à expressão dos genes presentes na *Agrobacterium rhizogenes*.

2.1.3.6. EXPRESSÃO DE EGFP NAS RAÍZES

Outra forma de verificar qualitativamente a transformação é pela visualização da emissão de fluorescência do *Egfp* ao microscópio com o filtro apropriado. A estabilidade da emissão desta fluorescência nas raízes transformadas foi verificada com plantas transformadas que permaneceram em tubetes com areia por 8 e 45 dias, sendo que a expressão da proteína fluorescente continuava ativa.

O nível de expressão do gene *Egfp* também foi avaliado de forma quantitativa, via RT-qPCR, nas raízes transformadas após oito dias de transferência para tubetes com areia. Nesta avaliação as raízes transformadas apresentaram uma expressão relativa de 19000 vezes, relativo ao controle (raízes não transformadas), como esperado.

2.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível estabelecer etapas importantes para obtenção de um importante aumento na eficiência do protocolo de transformação de raízes de soja via *A. rhizogenes*, aqui indicadas: utilização de sementes com 5 dias de germinação; execução da etapa de seleção visual via detecção de fluorescência ao microscópio do gene *Egfp*, com a eliminação das raízes não transformadas; exclusão da seleção via emprego do antibiótico higromicina; inclusão de uma etapa de aclimação via hidroponia antes das plantas serem transplantadas para tubetes com areia para ser utilizadas em experimentos.

Após a padronização do método de transformação via *A. rhizogenes*, os níveis de eficiência alcançados foram superiores aos descritos anteriormente por Li,

Todd e Trick (2010) e Lin et al. (2011). Na etapa de seleção foi verificada que a utilização do antibiótico higromicina é prejudicial à obtenção das plantas com raízes transformadas, uma vez que a eficiência geral quando utilizado higromicina na etapa de seleção foi de aproximadamente 33%, e 55% quando o antibiótico foi excluído do processo de seleção. A adição da etapa de aclimação via hidroponia contribuiu significativamente para maior recuperação das plantas, bem como obtenção de plantas com raízes mais vigorosas. Espera-se que, a partir deste trabalho, essa metodologia possa ser utilizada de modo ainda mais prático e rápido para estudos de análise funcional de genes em raiz de soja, como por exemplo, de genes envolvidos nas respostas de defesa à nematoides.

REFERÊNCIAS

- ALPIZAR, E. et al. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant cell reports**, v. 25, n. 9, p. 959–67, set. 2006.
- ALPIZAR, E. et al. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of botany**, v. 101, n. 7, p. 929–40, maio 2008.
- ALZOHAIRY, A. M.; MACDONALD, M. H.; MATTHEWS, B. F. The pJan25 vector series: an enhancement of the Gateway-compatible vector pGWB533 for broader promoter testing applications. **Plasmid**, v. 69, n. 3, p. 249–56, maio 2013.
- BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as Agrobactérias. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, p. 15–27, 2004.
- BONATO, E. R. **Estresses em soja**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000. p. 254
- BOSELUT, N. et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. **Plant cell reports**, v. 30, n. 7, p. 1313–26, jul. 2011.
- CHABAUD, M. et al. *Agrobacterium rhizogenes* -mediated root transformation. **Medicago truncatula handbook**, n. November, p. 1–8, 2006.
- CHATTOPADHYAY, T. et al. Development of a transgenic hairy root system in jute (*Corchorus capsularis* L.) with *gusA* reporter gene through *Agrobacterium rhizogenes* mediated co-transformation. **Plant cell reports**, v. 30, n. 4, p. 485–93, abr. 2011.

- COLLIER, R. et al. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 43, n. 3, p. 449–57, ago. 2005.
- DIAS, W. P. et al. Nematóides em soja: identificação e controle. **Embrapa Soja. Circular Técnica.**, n. 76, p. 1–8, 2010.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- EADY, C. C.; LISTER, C. E. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 1-2, p. 117–121, 3 nov. 1998.
- IBRAHIM, H. M. M. et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 90–9, jan. 2011.
- KANDOTH, P. K. et al. 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 genes in degenerating feeding cells. **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.
- 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, J.-F. et al. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. **Plant methods**, v. 5, n. 6, p. 1–15, jan. 2009.
- LIN, M.-H. et al. pHairyRed: a novel binary vector containing the DsRed2 reporter gene for visual selection of transgenic hairy roots. **Molecular plant**, v. 4, n. 3, p. 537–45, maio 2011.
- MANKIN, S. L. et al. Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 6, p. 521–535, 19 set. 2007.
- 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.
- MENDES, M. DE L.; RODRIGUEZ, P. B. N. Reação de Cultivares de Soja [*Glycine max* (L.) Merrill] aos Nematóides de Galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* Raças 1, 2, 3 e 4. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 211–217, 2000.

MIRANDA, V. D. J. et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC research notes**, v. 6, p. 196, jan. 2013.

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

NICOL, J. M. et al. Current Nematode Threats to World Agriculture. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Eds.). . **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.

PARKINSON, J. et al. A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. **Nature genetics**, v. 36, n. 12, p. 1259–67, dez. 2004.

PF AFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMP FLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36, 1 maio 2002.

ROYCHOWDHURY, D.; MAJUMDER, A.; JHA, S. Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. In: CHANDRA, S.; LATA, H.; VARMA, A. (Eds.). . **Biotechnology for Medicinal Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

SAVKA, M. et al. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. **Phytopathology**, v. 80, n. 5, p. 503–508, 1990.

VEENA, V.; TAYLOR, C. G. Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 5, p. 383–403, 16 nov. 2007.

VENKATACHALAM, L.; LOKESH, V.; BHAGYALAKSHMI, N. A Rare Event of Agrobacterium rhizogenes-assisted Genetic Transformation of “Silk” Banana (genotype-AAB). **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 03, n. 01, p. 13–17, 2011.

VOINNET, O. et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 33, n. 5, p. 949–56, mar. 2003.

WEBER, R. L. M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1070–1075, 2011.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in genetics : TIG**, v. 22, n. 7, p. 396–403, jul. 2006.

WILMINK, A.; DONS, J. J. M. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 165–185, jun. 1993.

YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. **Scientia Horticulturae**, v. 96, n. 1-4, p. 81–90, dez. 2002.

YOUSSEF, R. M. et al. Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots. **Experimental parasitology**, v. 134, p. 266–274, 2013.

3. CAPITULO 3 - ARTIGO 2: VALIDAÇÃO DE NORMALIZADORES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR EM PLANTAS COMPOSTAS DE SOJA EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Meloidogyne javanica*

KUMA, Kátia Miki. **Validação de normalizadores para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em plantas compostas de soja em resposta à infecção por *Meloidogyne javanica***. 2014. --fs. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR.

RESUMO

A obtenção de plantas compostas por transformação via *A. rhizogenes* constitui um método rápido para gerar plantas compostas, contendo raízes transformadas, com aplicação direta nos estudos de validação funcional de genes relacionados a estresses causados por fitopatógenos de raízes. As análises de RNAm conduzidas via RT-qPCR são amplamente utilizadas para a validação do perfil de expressão gênica, uma vez que constitui uma metodologia muito sensível, específica, rápida e com boa reprodutibilidade. Tais análises necessitam do emprego de genes normalizadores, cujo níveis de expressão permaneçam invariáveis entre os diferentes órgãos, estágios de desenvolvimento e tratamento em estudo. Desse modo, tais normalizadores são indispensáveis à precisão da quantificação da expressão gênica, eliminando variações devido à quantidade inicial de cDNA adicionado nas reações, garantindo que apenas as variações na expressão dos genes sejam consideradas. Neste trabalho sete genes comumente utilizados como normalizadores em ensaios de RT-qPCR (GmELF1- α , GmELF1- β , GmTUA, GmTUB, Gm β -actina, GmGAPDH e o GmRNAr18S) foram avaliados quanto à estabilidade de expressão em raízes transformadas via *A. rhizogenes*, submetidas à infecção com *Meloidogyne javanica*, nos períodos de inoculação de 8 e 50 dpi (dias após inoculação), a fim de identificar os melhores normalizadores sob tais condições. Os genes GmELF1- β e GmELF1- α foram os mais estáveis em todas as análises comparativas enquanto o gene GmGAPDH foi o que apresentou menor estabilidade.

Palavras-chave: Genes de referencia, validação, *Agrobacterium rhizogenes*

KUMA, Kátia Miki. **Housekeeping validation for studies of gene expression by RT-qPCR in composite soybean plants in response to infection by *Meloidogyne javanica***. 2014. --fs. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina –PR.

ABSTRACT

The production of composite plant by *A. rhizogenes* is a fast method to generate chimeric plants containing transformed roots, with direct application in functional validation studies of genes related to stresses caused by pathogens roots. The mRNA analyzes conducted by RT-qPCR are widely used for the validation profile of gene expression, since it is a very sensitive, specific, fast and with good reproducibility method. These analyzes require the use of housekeeping genes whose expression levels remain unchanged between the different organs, developmental stages and study treatment. Thus, normalizing is essential to the accuracy of quantification expression gene, eliminating variation due to the initial amount of cDNA added to the reaction, ensuring that only changes in gene expression are considered. In this work seven genes commonly used as a housekeeping gene in RT-qPCR assays (GmELF1- α , β -GmELF1, GmTUA, GmTUB, Gm β -actin, and GmGAPDH GmRNAr18S) were evaluated the stability of expression in transformed and untransformed roots via *A. rhizogenes*, subject to infection with *Meloidogyne javanica*, during periods of inoculation 8 and 50 dpi (days after inoculation) in order to identify the best normalizing genes under such conditions. The GmELF1- β and GmELF1 - α genes were the most stable in all benchmarks, while the GmGAPDH gene showed the lowest stability.

Key-words: Housekeeping gene, validate, *Agrobacterium rhizogenes*

3.1. INTRODUÇÃO

Uma das estratégias para o estudo funcional de genes é a utilização de métodos de transformação transiente (LI et al., 2009), pois trata-se de um sistema rápido, flexível, que permite uma análise em larga escala, não é afetado pela posição cromossomal, com a possibilidade de utilização em tecidos diferenciados de plantas, além de ser considerado um método seguro, uma vez que o transgene não é transmitido para a prole (VOINNET et al., 2003). Um método de transformação transiente utilizado em soja para o estudo funcional de genes em raízes é o que emprega a *Agrobacterium rhizogenes*.

A transformação via *Agrobacterium* utiliza a capacidade desta bactéria de transferir fragmentos de DNA externo para as células das plantas sem danificar a parede celular da mesma (LI et al., 2009), utilizando o DNA de transferência (T-DNA). A partir desta técnica é possível produzir raízes contendo e expressando o gene de interesse, de forma rápida e eficiente (ALPIZAR et al., 2006), pois é capaz de gerar plantas compostas em que as raízes adventícias são transformadas com o transgene e o restante da planta não (WEBER; BODANESE-ZANETTINI, 2011).

A PCR em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR), é uma técnica amplamente utilizada em diferentes áreas da genômica funcional (REBOUÇAS et al., 2013), sendo empregada nas análises de expressão gênica (quantificação dos níveis de expressão de genes específicos). O método permite a validação de genes individualmente, contribuindo para uma melhor compreensão dos diferentes processos celulares, determinando quais genes tem maior relevância na regulação destes processos (VANDESOMPELE et al., 2002; BUSTIN, 2000; HU et al., 2009). Esta técnica é muito utilizada devido a sua alta sensibilidade, especificidade, rapidez e boa reprodutibilidade (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; HUGGETT et al., 2005; LE et al., 2012; LIU; SAINT, 2002; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN et al., 2000).

Nas análises realizadas via RT-qPCR, as amostras de mRNA podem apresentar variação da quantidade e integridade deste RNA, na eficiência da síntese de cDNA (Transcrição reversa) e também na eficiência da PCR, por exemplo, devido a variação na quantidade de inibidores entre as amostras. Tais variáveis podem levar a sub ou superestimativas nos níveis de expressão de um determinado gene alvo, para minimizar algumas das interferências, os ensaios de quantificação da

expressão gênica utilizam genes normalizadores ou de referência (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; DEKKERS et al., 2012; HUGGETT et al., 2005; LE et al., 2012; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000). Tais genes devem apresentar sua expressão constante em todos os tipos de tecidos e células e em diferentes tratamentos em que o indivíduo/tecido possa ser submetido, porém, até o momento, nenhum foi encontrado e provavelmente não exista. Como na maioria dos experimentos há uma restrição no tipo de tecido utilizado, para a comparação de tratamentos (tratados e não tratados) é possível identificar um ou mais genes de referência expresso de forma constitutiva e estável para pelo menos a condição em estudo (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

Alguns dos genes comumente utilizados como normalizadores em ensaios de RT-qPCR são: gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH – importante enzima da via glicolítica), actina (α - e β -actina – essenciais para a estrutura e cinética do citoesqueleto), tubulina (α - e β -tubulina – TUA e TUB, respectivamente, essenciais para a estrutura e cinética do citoesqueleto), subunidades ribossomais (RNAr 18S ou 28S), ubiquitina (gene envolvido com a degradação proteica), albumina, ciclofilina (importante para o dobramento de proteínas e as interações proteicas), fator de alongamento (ELF1- α e - β) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012; HU et al., 2009; HUGGETT et al., 2005; LIBAULT et al., 2008; MIRANDA et al., 2013; MULLER et al., 2002; PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000; THELLIN et al., 1999). Nos ensaios em soja envolvendo a infecção com nematoides, foram identificados os genes GmELF1- α e GmTUA como normalizadores (MIRANDA et al., 2013), no entanto, para estudos envolvendo bioensaios com nematoides que utilizam plantas compostas, cujas as raízes estejam silenciando ou superexpressando genes, os normalizadores ainda não foram descritos.

Atualmente, existem vários programas disponíveis para auxiliar a identificação de genes normalizadores para uma condição, estágio ou órgão específico, tais como o Genorm (VANDESOMPELE et al., 2002), o BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e o NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004). Estas ferramentas permitem a identificação de um melhor gene de referência para um grupo de amostras/tratamento, e se necessário calculam um fator de

normalização quando são utilizados vários genes normalizadores em conjunto (DEKKERS et al., 2012; HU et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi identificar genes normalizadores para análises via RT-qPCR em bioensaios com *M. javanica*, em plantas compostas de soja, superexpressando os genes GmHsp22.4 e GmHsp17.6B.

3.2. MATERIAL E MÉTODO

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os genótipos PI595099 e Williams 82, resistente e suscetível ao nematoide de galhas *Meloidogyne javanica*, respectivamente. A cultivar Williams 82 foi utilizada na etapa de transformação, via *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599, com o vetor binário pH7WG2D-1 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002), compatível com o sistema “Gateway”.

3.2.2. CONSTRUÇÃO DOS CASSETES E TRANSFORMAÇÃO DA *Agrobacterium rhizogenes*

O DNA da cultivar Williams 82 foi extraído pelo método Doyle e Doyle (1987) e utilizado para a amplificação via PCR da região codificadora dos genes de interesse, utilizando pares de iniciadores específicos para cada região codificadora, GmHsp22.4 (*Small heat shock protein*) [*Forward* (5' ATGAGGCTGCCACAACCTAAA 3') e o *Reverse* (5' TCAAAGCTCCTGCTTGACC 3')], que produzem um fragmento de 588pb] e GmHsp17.6B [*Forward* (5' CAGAATTCCTGTTTACGATCTC 3') e o *Reverse* (5'CGATGACAATGACACACAGC 3')], que produzem um fragmento de 731pb].

Esses fragmentos foram ligados ao vetor de entrada pCR™8/GW/TOPO®, conforme instrução do pelo fabricante (pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit). O vetor de entrada vazio e com os fragmentos de interesse foram introduzidos em células de *Escherichia coli* (cepa DH5α) eletrocompetentes, via eletroporação, utilizando o eletroporador MicroPulser (Bio-Rad) preparado para 1,8 kV, 25µF, com

controlador de pulso para 200 ohms. Utilizou-se 5µL do produto da reação de ligação e 80 µL de células eletrocompetentes.

O vetor de entrada com os fragmentos de interesse foram utilizados para realizar a reação de recombinação com o vetor de destino (pH7WG2D,1). Este vetor apresenta o gene *Egfp*, um gene marcador que codifica uma proteína de fluorescência verde (GFP - *green-fluorescent protein*) sob regulação do promotor *roID* e ligado a um sinalizador alvo do retículo endoplasmático, além de genes de resistência aos antibióticos espectinomicina, estreptomicina e higromicina. Além disso, o vetor possui no sítio de clonagem o promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor, que é altamente ativo em plantas. Para a reação de recombinação foi utilizado o KIT da Invitrogen - *Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix*, conforme instrução do fabricante.

O vetor de destino foi utilizado para transformação de células de *Escherichia coli* (cepa DH5α) eletrocompetentes, via eletroporação. A cepa de *E. coli* (DB3.1), que apresentam o gene mutante *gyrA462*, que confere resistência ao gene (CcdB), foi utilizado para a transformação do vetor de destino vazio. O gene CcdB é letal e tem como alvo a DNA girase de células não mutantes para o gene *gyrA462* (BERNARD, 1996), permitindo a seleção positiva das células de *E. coli* que receberam o vetor de destino com o gene de interesse. O DNA plasmidial foi extraído com o Kit *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification* da Invitrogen e utilizado em reações de sequenciamento para confirmação da clonagem correta dos genes.

A cepa *Agrobacterium rhizogenes k599* foi utilizada para a transformação com o vetor de destino contendo as construções corretas via eletroporação, utilizando o eletroporador *MicroPulser (Bio-Rad)* com o programa AgR, preparado para 2,2kV, 25µF, com controlador de 1 pulso para 200 ou 400ohms. Utilizou-se 60ng do produto da reação de ligação e 40µL de células eletrocompetentes de *A. rhizogenes*. A recuperação das células foi realizada em uma suspensão de bactérias em 1mL de meio YEP líquido (sem antibiótico), em tubo *Falcon* de 15mL estéril, e foram incubadas a 28°C, por 2h sob agitação de 200rpm. Após este período, 100µL de células eletroporadas foram plaqueadas, em meio YEP sólido contendo 100µg/mL de Espectinomicina (resistência da *A. rhizogenes*), 100µg/mL de Higromicina (resistência do vetor de destino). E as placas foram incubadas a 28°C durante a noite.

Após a transformação, uma colônia de cada construção (vetor pH7WG2D vazio, região codificadora do GmHsp22.4 e do GmHsp17.6B) foi selecionada para a extração do DNA plasmidial via lise alcalina. O DNA plasmidial foi utilizada para a reação de confirmação da transformação da *A. rhizogenes* com o vetor por PCR (clones recombinantes), utilizando o conjunto de iniciadores específicos para o vetor de destino pH7WG2D (*Forward* – 5' GCGGGGTCATAACGTGACT 3'; *Reverse* – 5' CGCACAATCCCCTATCCTT 3'). Para o vetor vazio espera-se uma banda de aproximadamente 2198pb, e para aqueles transformados com a região codificadora do GmHsp22.4 e GmHsp17.6B, uma banda de 1331pb e 1474pb, respectivamente.

3.2.3. PRODUÇÃO DE PLANTAS COMPOSTAS

Sementes da cultivar Williams 82 foram esterilizadas [etanol 70% por 10 minutos, depois imersas em solução de hipoclorito 1% por 20 minutos e lavadas com água destilada três vezes]. E colocadas para germinar por 4 e 5 dias. Esses embriões foram utilizados na transformação via *A. rhizogenes*, produção das plantas compostas.

Inicialmente foi removida a radícula, com um corte na região de separação entre o hipocótilo e a radícula. Logo depois, as plântulas de soja foram inoculadas com 0,1mL de células de *A. rhizogenes* contendo as construções de interesse (inóculo) na região do hipocótilo, através de três injeções (utilizou-se seringa de 1mL) paralelamente ao feixe vascular. As plântulas inoculadas foram transferidas para o meio de co-cultivo sólido [6g/L de ágar, ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitamina Gamborg B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), 1,90g/L MES, 1mL/L Dithiothreitol [1M] e Tiosulfato de sódio [1M], pH 7,0).

Após sete dias, as plantas foram transferidas para um meio de seleção contendo 15µg/mL de higromicina e 100µg/mL de cefotaxime, onde foram mantidas por 10 dias. Paralelamente à seleção das raízes transformadas pelo antibiótico higromicina, foi realizada uma inspeção e seleção baseado na observação visual da proteína GFP (*Egfp*), em microscópio de fluorescência Leica MZIII (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Os filtros empregados para a detecção de *Egfp* apresentam um módulo de fluorescência que contém uma lâmpada Leica 106Z de 50 ou 100W de alta pressão e vapor de mercúrio, e dois conjuntos de filtros para

Egfp (470/40 nm). As raízes não transformadas são excisadas e as plantas que não apresentam raízes transformadas são descartadas.

Após esta seleção, as plântulas compostas foram transplantadas para uma etapa de hidroponia para aclimatação, por aproximadamente 10 dias. 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, sendo então as plantas positivas transferidas para tubetes com areia e cultivadas em temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, com umidade de $90\% \pm 10\%$.

Plantas utilizadas como controle (Williams 82) em todas as etapas de transformação, foram injetadas com água destilada.

3.2.4. CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO

A confirmação da transformação foi realizada pela inspeção visual da expressão da proteína GFP (*Egfp*), em microscópio de fluorescência Leica MZIII (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), ao longo do experimento, até 50 dias após a infecção com *M. javanica*.

Adicionalmente, a transformação das raízes foi confirmada via PCR. A raiz foi utilizada para extração de DNA conforme o protocolo de Doyle e Doyle (1987), e posteriormente as amostras foram amplificadas via PCR com o conjunto de iniciadores específicos para o vetor de destino pH7WG2D (*Forward* – 5' GCGGGGTCATAACGTGACT 3'; *Reverse* – 5' CGCACAATCCCCTATCCTT 3'). O mix da PCR continha 1 μL [100ng] de DNA, 2,5 μL de tampão [10x], 1 μL de MgCl_2 a [25mM], 1 μL de dNTPs Mix a [2,5mM], 1 μL de iniciadores, *forward* e *reverse*, a [10 μM], e 0,2 μL Taq DNA Polimerase [5U/ μL] em um volume final de 25 μL . As ciclagens da PCR foram, 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C , o anelamento por 45 segundos a 62°C e a extensão por 45 segundos a 72°C . No final, utilizou-se uma etapa de 5 minutos a 72°C de extensão. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de eletroforese, preparado com agarose 1%, tampão SB 1x e corado com 1 μL /10mL de brometo de etídio (10mg/mL). Para a aquisição e armazenamento das imagens foi utilizado o equipamento transluminador e fotodocumentador *Loccus*. Para raízes transformadas com o vetor vazio espera-se uma banda de aproximadamente 2198pb, e para

aqueles transformados com a região codificadora do GmHsp22.4 e GmHsp17.6B, uma banda de 1331pb e 1474pb, respectivamente.

Paralelamente, os níveis de expressão dos transcritos *Egfp* das raízes transformadas, foi avaliado aos 8dpi, via RT-qPCR, via metodologia SYBR green. Primeiramente foi realizada a eficiência da reação de amplificação para o par de iniciadores do gene estudado (*Egfp: Forward* – 5' TGACCCTGAAGTTCATCTGC 3' e *Reverse* – 5' AAGTCGTGCTGCTTCATGTG 3'). As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador ABI PRISM® 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) utilizando o kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)*. Na reação de quantificação relativa foi adicionada 6,25 µL de *SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (composto *Platinum® Taq DNA polymerase*, fluoróforo *SYBR Green I dye*, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, dGTP, dATP, dCTP, dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e 0,1µM de fluoróforo ROX), 0,2µM de cada iniciador R e F, 1µL de cDNA na concentração 10⁻¹ e água Milli Q para um volume final de 12,5µL. As ciclagens utilizadas nas reações foram: 95°C por 10 minutos (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (pareamento) e a 60°C por 1 minuto (extensão), os dados foram coletados nesta etapa. Depois foi conduzida uma etapa de desnaturação lenta, com elevação da temperatura de 1°C/minuto, para a construção da curva de dissociação e verificação de possível amplificação inespecífica.

A quantificação relativa da expressão do gene *Egfp* foi realizada utilizando triplicatas técnicas de cada uma das três repetições biológicas. Os valores de Ct das raízes transformadas foram comparadas com as das raízes controle (não transformadas), sendo os níveis de expressão do gene alvo e sua significância estatística estimados utilizando o programa REST2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

3.2.5. OBTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO DE *Meloidogyne javanica*

Para a obtenção do inóculo, uma população de *Meloidogyne javanica* foi multiplicada na casa de vegetação do Setor de Nematologia da Embrapa Soja, em plantas de amendoim, por três meses. Para a extração dos nematoides, as raízes dessas plantas foram processadas segundo técnica de Boneti e Ferraz (1981), lavadas, cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador.

Essa amostra foi peneirada em tamis de 200 e 500 mesh. O tamis de 500 mesh foi lavada em água corrente e o seu conteúdo (ovos, larvas e nematoides adultos) recuperado. Após três dias em câmara de eclosão, os juvenis de segundo estágio viáveis foram coletados, durante três dias consecutivos.

O material obtido da extração e da eclosão foram quantificados em lâmina de Peters, utilizando 1mL da suspensão para a projeção da quantidade de indivíduos. O inóculo com o nematoide foi ajustado para conter 125 indivíduos/mL. Para a inoculação das plantas, 4mL de juvenis de segundo estágio foram inoculadas ao lado da raiz da planta (inoculação de 500 juvenis do nematoide por planta), com auxílio de uma pipeta automática, através de um pequeno orifício aberto no solo.

3.2.6. BIOENSAIOS COM *Meloidogyne javanica* EM SOJA

As plantas compostas de soja da variedade Williams 82 expressando os genes sHsp20 e os controles foram utilizados em bioensaio com a infecção do nematoide *M. javanica*. O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições biológicas compostas de 3 plantas individuais cada, e uma estrutura de tratamentos com dois fatores: tempo de inoculação (dias após inoculação - 8dpi e 50 dpi), e genótipos utilizados (cultivar Williams 82 com raízes transformadas, superexpressando os genes GmHsp22.4 e do GmHsp17.6, cultivar Williams 82 com raízes transformadas com o vetor vazio, cultivar Williams 82 não transformadas e a PI595099). Todos os materiais foram inoculados com cerca de 500 juvenis (J2) do nematoide por planta.

Após 8 e 50 dias da inoculação (dpi), a raiz de cada planta foi coletado, lavado com água destilada para eliminar o excesso de areia, e, em seguida, envolta em papel alumínio e armazenado em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Todas as amostras coletadas foram mantidas em ultrafreezer a -80° C.

3.2.7. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Cada amostra coletada foi macerada utilizando-se pistilo, almofariz e nitrogênio líquido. Após a maceração, as amostras foram distribuídas em microtubos de 1,5mL e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

A extração do RNA total das raízes transformadas foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as soluções e utensílios para os procedimentos foram preparadas e tratados com água DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada, que atua inativando RNAses através da degradação dos resíduos de histidina presentes na enzima. Adicionou-se 1mL de reagente Trizol para cada 100mg de tecido e a amostra foi homogeneizada em vortex por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 μ L de clorofórmio para cada 1mL de Trizol e agitou-se vigorosamente por 15 segundos e foi deixado em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. O clorofórmio adicionado ao tampão contendo RNA solubiliza os lipídios da membrana celular e nuclear, removendo-os uma vez que a fase aquosa e orgânica são separadas. Foi realizada a centrifugação a 18000g por 15 minutos a 4°C. E a fase líquida foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se 500 μ L de isopropanol para cada mL de Trizol utilizado anteriormente para precipitar o RNA. Depois, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e foi realizada nova centrifugação a 18000g por 10 minutos a 4°C, para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75%. O etanol foi removido por centrifugação a 14000g por 5 minutos a 4°C e o precipitado ressuspenso em 50 μ L de água tratada com DEPC autoclavada.

A concentração de RNA total das amostras foi determinada em espectrofotômetro (nanodrop) e a integridade visualizada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (EtBr), em tampão SB 1X. Após a extração, todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C.

Após a extração do RNA total foi realizado o tratamento das amostras com a enzima Desoxiribonuclease I (Kit *Invitrogen* - DNase I), para eliminar moléculas de DNA presentes nas amostras. O produto deste tratamento foi utilizado para a síntese de cDNA. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit *SuperScript III* da *Invitrogen*, conforme orientação do fabricante.

3.2.8. ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO – RT-QPCR

As sequências dos iniciadores para amplificação dos genes normalizadores a serem testados neste estudo foram obtidos da literatura GmELF1- α (Elongation Factor 1- α), (MIRANDA et al., 2013; WANG et al., 2012), GmELF1- β (Elongation

Factor 1- β) (MIRANDA et al., 2013; NAKAYAMA et al., 2014; WANG et al., 2012), GmTUA (Alfa-tubulina) (MIRANDA et al., 2013; NAKAYAMA et al., 2014), GmTUB (Beta-tubulina) (MIRANDA et al., 2013; NAKAYAMA et al., 2014; WANG et al., 2012), Gm β -actina (NAKAYAMA et al., 2014; STOLF-MOREIRA et al., 2011), GmGAPDH (STOLF-MOREIRA et al., 2011) e o GmRNAr18S (NAKAYAMA et al., 2014; STOLF-MOREIRA et al., 2011). A sequência de todos os iniciadores encontram-se na tabela 1.

Inicialmente, a eficiência de todos os iniciadores dos genes normalizadores foi determinada e ajustada, a fim de minimizar variações em função da eficiência de cada sistema. A eficiência foi estimada através de uma série de diluições seriadas do cDNA (5^0 a 5^{-4}), onde foram testadas diferentes concentrações finais dos iniciadores. Os valores de Ct (*Cycle threshold* – ponto em que o sinal de amplificação é detectado) obtidos foram plotados em função do logaritmo das diluições, e o índice de inclinação da reta (*slope*) formada foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema de acordo com a fórmula $E=[5^{-1/slope}]^{-1}$ (PFAFFL, 2001).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores dos genes normalizadores utilizados nas reações de RT-qPCR

Nome dos iniciadores	Sequencia - Forward	Sequencia - Reverse
GmELF1- α	5' GAC CTT CTT CGT TTG TCG CA 3'	5' CGA ACC TCT CAA TCA CAC GC 3'
GmELF1- β	5' GTT GAA AAG CCA GGG GAC A 3'	5' TCT TAC CCC TTG AGC GTG G 3'
GmTUA	5' AGG TCG GAA ACT CCT GCT GG 3'	5' AAG GTG TTG AAG GCG TCG TG 3'
GmTUB	5' CCT CGT TCG AAT TCG CTT TTT G 3'	5' CAA CTG TCT TGT CGC TTG GCA T 3'
Gm β -actina	5' GAG CTA TGA ATT GCC TGA TGG 3'	5' CGT TTC ATG AAT TCC AGT AGC 3'
GmGAPDH	5' GTG GAG ACC CAT TGG AGG AA 3'	5' TGG TTT GCT GCT GGT AAT GGT A 3'
GmRNAr18s	5' AAA CGG CTA CCA CAT CCA AGG 3'	5' CCT TCA ATG GAT CCA TCG TTA 3'

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador ABI PRISM® 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen). Na reação de quantificação relativa foi adicionada 6,25 μ L de SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (composto Platinum® Taq DNA polymerase, fluoróforo SYBR Green I dye, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, dGTP, dATP, dCTP, dUTP, uracil DNA glicosilase

(UDG) e 0,1 μ M de fluoróforo ROX) e, 0,2 μ M de cada iniciador R e F, 1 μ L de cDNA de cada diluição e água Milli Q para um volume final de 12,5 μ L.

As ciclagens utilizadas nas reações foram: 95°C por 10 minutos (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (pareamento) e a 60°C por 1 minuto (extensão), os dados foram coletados nesta etapa. Depois foi conduzida uma etapa de desnaturação lenta, com elevação da temperatura de 1°C/minuto, para a construção da curva de dissociação e verificação de possível amplificação inespecífica.

Para a reação de quantificação relativa foi utilizada 1 μ L de cDNA na concentração 10⁻¹, adicionado em um mistura contendo 6,25 μ L de SYBR Green qPCR SuperMix-UDG e 0,2 μ M de cada iniciador R e F, para um volume final de 12,5 μ L (kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* –Invitrogen). Depois foi realizada a etapa de dissociação, para verificação de possível amplificação inespecífica.

Os valores de Ct de cada gene normalizador obtidos, nos diferentes tratamentos, foram analisados no programa RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Este programa realiza simultaneamente a análise dos dados pelos programas BestKeep, GeNorm, Normfinder e pelo método de comparação de Δ -Ct, permitindo identificar os normalizadores mais estáveis baseado em diferentes estatísticas. Além disso, o programa apresenta um ranking final dos melhores normalizadores baseado na média geométrica dos dados de classificação dos quatro programas, para cada gene individual. A estabilidade de expressão dos genes normalizadores foi analisada visando avaliar os seguintes efeitos:

- da superexpressão dos genes *GmHsp22.4* e *GmHsp17.6B*: comparação entre as plantas transformadas com cada gene e as plantas transformadas com o vetor vazio;
- do tempo de exposição ao patógeno *M. javanica*: comparação entre as plantas transformadas com cada gene e as plantas transformadas com o vetor vazio em diferentes tempos após a infecção com *M. javanica* e em cada tempo individualmente;
- da transformação da raiz com a *Agrobacterium rhizogenes*: comparação entre todas as plantas transformadas (com o vetor vazio pH7WG2D, codante do

gene *GmHsp22.4* e do gene *GmHsp17.6B*) e todas as plantas não transformadas (as amostras de controle, cultivar Williams 82 e cultivar PI595099);

3.2.9. CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO PELO PATÓGENO

A infecção com o nematoide foi confirmada por PCR após 8 dpi. O DNA das amostras foram extraídos utilizando o protocolo descrito por Rahman et al. (2010) e a integridade avaliada por eletroforese. Utilizou-se 50mg de tecido e 1mL de tampão de extração de DNA [4% (w/v) CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4M NaCl, 50% mM Na-EDTA (pH 8,0) e 1 (w/v) DTT]. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 5 minutos à temperatura ambiente. Depois, foram incubadas por 30 minutos a 55°C. Em seguida foi realizada centrifugação a 18000g em temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido um novo tubo. A seguir adicionou-se 200µg de RNase A por mL de tampão de extração e realizou-se a incubação por 15 minutos a 37°C. Após o período de incubação, adicionou-se igual volume de fenol: clorofórmio: álcool Isoamílico [25:24:1]. Foi feita nova centrifugação a 18000g por 5 minutos a 4°C, e transferiu-se o sobrenadante para um tubo novo. Um volume igual de clorofórmio: álcool Isoamílico [24:1] foi adicionado ao tubo. As amostras foram vigorosamente agitadas em vórtex e centrifugadas a 18000g durante 5 minutos a 4°C, e em seguida houve nova transferência do sobrenadante para um tubo novo. Para a precipitação do DNA adicionou-se 350µL de isopropanol gelado, misturado por inversões. Após incubação a -80°C por 1h as amostras foram descongeladas sem agitação a 4°C. Em seguida, foram centrifugadas a 20000g durante 20 minutos a 4°C. o sobrenadante foi descartado e de etanol 70% (v/v) foi adicionado. A solução foi centrifugada a 14000g por 5 minutos, em temperatura ambiente e descartou-se novamente o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido em 20 uL de água Milli-Q. A concentração e qualidade das amostras foram determinadas em espectrofotômetro (A260/280 e A260/230) utilizando NanoDrop ® ND-1000 espectrofotômetro (Produtos Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

Para a reação de PCR de detecção da infecção pelo nematoide foram utilizado o par de iniciadores específicos para a detecção da espécie *M. javanica* (*Foward* – 5' CAAAACCACGCGGCTTCGGC 3'; *Reverse* – 5'

TGGGGGTGCCCTTCCGTCAA 3'), obtendo-se uma banda de aproximadamente 945bp. A reação de PCR consistiu de 1µL de DNA [30ng/µL], 18,3µL de água Milli-Q, 2,5 µL de tampão de PCR [10x], 1µL de dNTPs Mix a [2,5mM], 1µL de MgCl₂ a [50mM], 0,5µL PCR iniciador, *forward* e *reverse*, a [10µM] e 0,2µL Taq DNA Polimerase [5U/µL] do Kit PCR *Invitrogen*. As reações foram incubadas em termociclador para a amplificação dos fragmentos utilizando-se o programa: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e um passo adicional de 72°C por 7 minutos.

Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de eletroforese, preparado com agarose 1,5%, tampão SB 1x e corado com 1µL/10mL de brometo de etídio (10mg/mL). Para a aquisição e armazenamento das imagens foi utilizado o equipamento transluminador e fotodocumentador Locus.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DA *Agrobacterium rhizogenes*

Após a construção dos cassetes com os genes de interesse, contendo as regiões codificadoras dos genes GmHsp17.6B e GmHsp22.4, células de *Agrobacterium rhizogenes* foram transformadas para serem utilizadas nas transformações dos embriões de soja. Após a transformação da *A. rhizogenes*, foi realizada uma PCR para confirmar a presença dos fragmento de interesse. Essa confirmação é importante para garantir que as raízes transgênicas produzidas apresentem o gene a ser estudado. Os resultados da PCR foram positivos quando comparados os clones de *A. rhizogenes* e os controles de cada fragmento de interesse e o vetor pH7WG2D vazio (Figura 1).

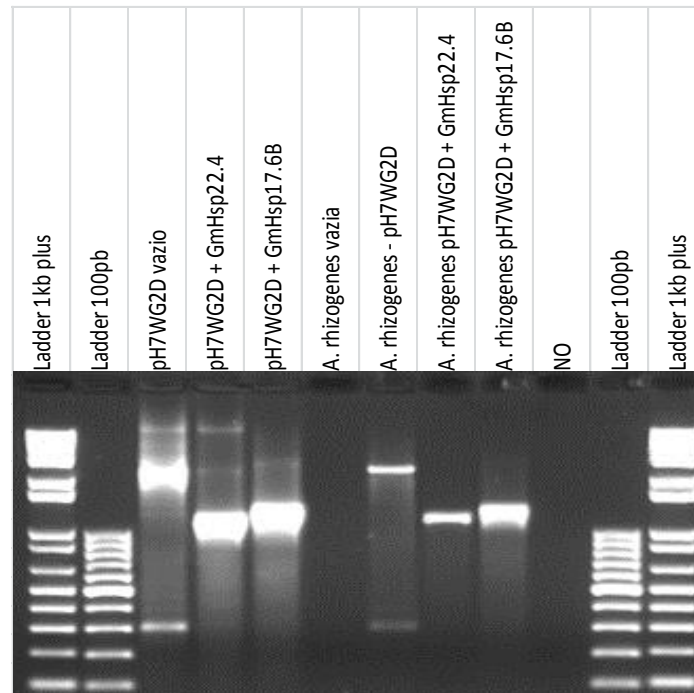


Figura 1: Confirmação da clonagem dos genes alvo e controles em *Agrobacterium rhizogenes* utilizando o vetor pH7WG2D, e as construções dos genes GmHsp17.6B e GmHsp22.4.

3.3.2. CONFIRMAÇÃO DAS PLANTAS COMPOSTAS

Uma das formas de verificar a presença de raízes transformadas nas plantas compostas é de forma qualitativa, pela visualização da emissão de fluorescência do *Egfp* ao microscópio com o filtro apropriado. As raízes transformadas apresentaram fluorescência facilmente observada sob o filtro do microscópio, enquanto as não transformadas não apresentam fluorescência (Figura 2). Esse tipo de confirmação de transformação é utilizada em vários trabalhos como o de Collier et al. (2005), Hernandez-Garcia et al. (2010), IBRAHIM et al. (2011), Mohammadi-Dehcheshmeh et al. (2013), Weber e Bodanese-Zanettini (2011), Li, Todd e Trick (2010), entre outros. Essa verificação visual foi realizada tanto em plantas coletadas com 8dpi quanto em 50dpi, e todas as plantas inspecionadas apresentaram fluorescência ao microscópico.

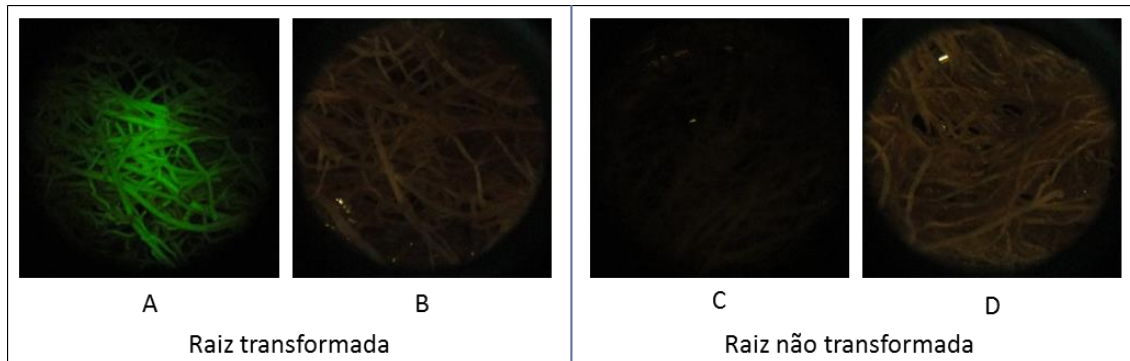


Figura 2. Perfil de expressão do *Egfp* em raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes*. A) Raiz transformada sob microscópio de fluorescência. B) Raiz transformada sob microscópio sem fluorescência. C) Raiz não transformada sob microscópio de fluorescência. D) Raiz não transformada sob microscópio sem fluorescência.

A confirmação das transformações das raízes foi conduzida pela detecção da presença dos fragmentos de interesse via PCR, utilizando iniciadores específicos para o vetor pH7WG2D. Sendo verificado a presença das construções, uma vez que a banda da amostra contendo a região codante do gene GmHsp22.4 apresentou uma altura de aproximadamente 1331pb, o do GmHsp17.6B, 1474pb e o vetor vazio apresentou uma banda de aproximadamente 2198pb, como esperado para cada construção (Figura 3).

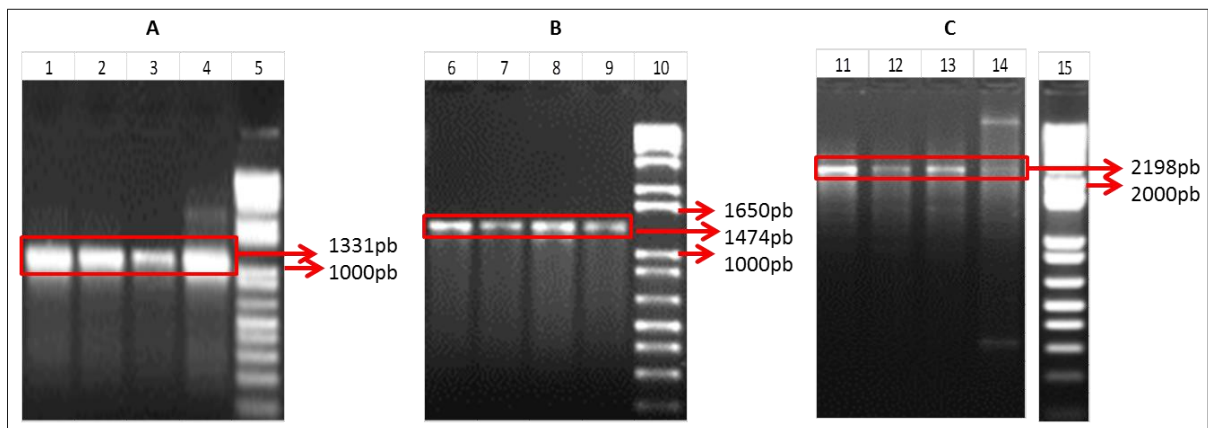


Figura 3. PCR de confirmação da transformação das raízes com os fragmentos de interesse. A) Amostra de raiz transformada contendo a região codante do gene GmHsp22.4 – 1,2 e 3 amostras, 4 controle positivo, 5 Ladder 1Kb plus (fragmento de 1331pb); B) Amostra de raiz transformada contendo a região codante do gene GmHsp17.6B – 6, 7 e 8 amostra, 9 controle positivo, 10 Ladder 1Kb plus (fragmento com aproximadamente 1474pb) ; C) Amostra de raiz transformada contendo o vetor vazio (pH7WG2D), - 11,12 e 13 amostra, 14 controle positivo, 15 Ladder 1Kb plus utilizado como marcador no mesmo gel das amostras contendo o vetor vazio (banda de aproximadamente 2198pb).

Adicionalmente, os níveis de expressão dos transcritos *Egfp* foi determinado 8 dias após a inoculação (dpi). Os níveis de expressão do gene *Egfp* nas raízes transformadas com cada uma das construções (pH7WG2D, GmHsp22.4 e GmHsp17.6B) foi significativamente superior quando comparado com as raízes não transformadas, e estáveis quando comparada entre as construções. O nível de expressão em raízes transformadas com o vetor vazio (pH7WG2D) foi de 19045 vezes superior aos níveis de expressão nas plantas não transformadas, enquanto nas raízes transformadas com as regiões codantes dos genes GmHsp22.4 e GmHsp17.6B foi de 18711 e 15014 vezes (Figura 4).

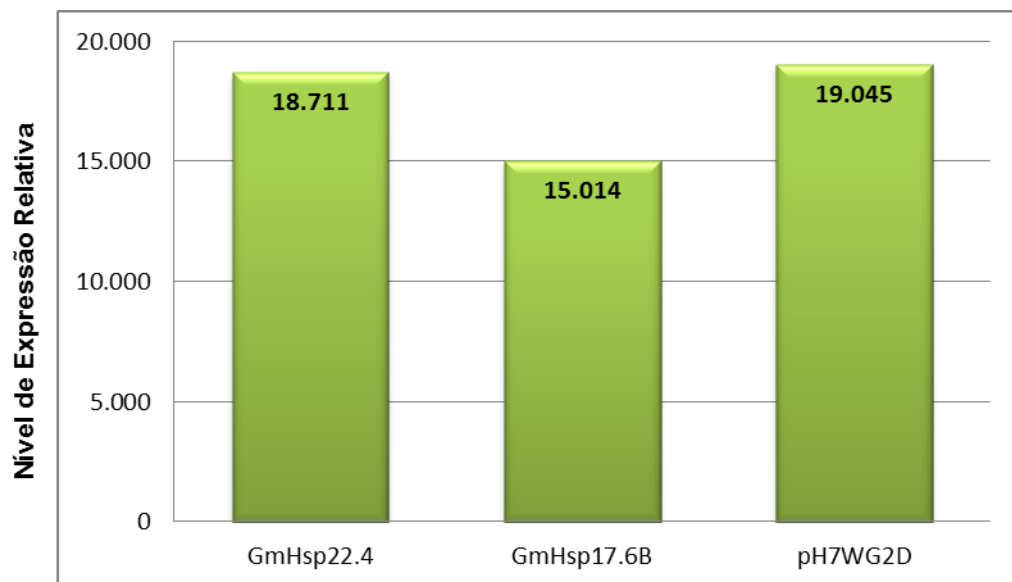


Figura 4. Níveis de Expressão do gene *Egfp* nas raízes transformadas com as construções pH7WG2D, *GmHsp22.4* e *GmHsp17.6B*

A PCR utilizando iniciadores específicos para o nematoide *Meloidogyne javanica* foi utilizado para confirmar o sucesso da infecção das raízes. Todas as plantas infectadas foram avaliadas, sendo possível detectar a presença da banda específica indicando a presença do patógeno nas raízes (Figura 5).

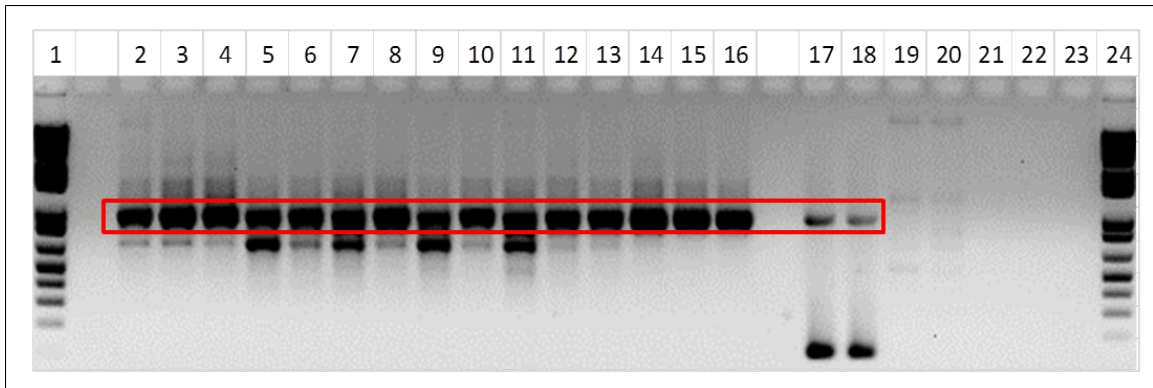


Figura 5. Confirmação da presença de nematoides nas raízes coletadas em 8dpi. 1e 24 – Ladder 1Kb Plus; 2 a 4 – plantas não transformadas; 5 a 7 – raízes transformadas com vetor vazio (pH7WG2D); 8 a 10 – raízes transformadas com a codante do gene GmHsp22.4; 11 a 13 – raízes transformadas com a codante do gene GmHsp17.6B; 14 a 16 – cultivar PI595099, não transformada; 17 e 18 – controle, DNA de *Meloidogyne javanica*; 19 e 20: controle negativo, DNA extraído de folha de soja; 21 a 23 – Branco.

3.3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES NORMALIZADORES

A eficiência de amplificação via RT-qPCR foi superior a 86% para todos os iniciadores específicos dos genes normalizadores avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência dos iniciadores em %

Genes	Eficiência dos iniciadores (%)
GmELF1- α	99,25
GmELF1- β	97,74
GmTUA	95,43
GmTUB	86,01
Gm β -actina	87,95
GmGAPDH	88,03
GmRNAr18s	93,92

Os genes normalizadores GmELF1- β , GmELF1- α e GmTUA foram os mais estáveis quando ambos os tempos de exposição ao patógeno *M. javanica* foram avaliados tanto da análise individual de cada tempo (8 e 50 dpi), como os tempos combinados, com exceção análise das amostras em 8dpi, onde o gene GmTUB foi o segundo mais estável. Apesar disto, os níveis de expressão dos genes GmELF1- β e GmELF1- α foram os que apresentaram menor variação quando os diferentes tempos de inoculação com *M. javanica* foram comparados (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação dos genes normalizadores nos diferentes tempos de exposição ao patógeno *M. javanica* – 8 e 50 dpi, individualmente e combinados.

8 dpi		50 dpi		8 e 50 dpi	
Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*	Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*	Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*
ELF1-B	1.57	ELF1-B	1.00	ELF1-B	1.68
TUB	2.00	ELF1-A	1.86	ELF1-A	1.78
ELF1-A	2.21	TUA	2.71	TUA	2.71
TUA	2.91	TUB	4.43	Beta-actina	3.66
Beta-actina	5.23	RNAr18S	4.95	TUB	4.43
GAPDH	5.73	Beta-actina	5.96	RNAr18S	4.61
RNAr18S	7.00	GAPDH	6.44	GAPDH	7.00

*Média geométrica dos valores de estabilidade dos programas utilizados pelo RefFinder (Genorm, NormFinder, BestKeeper e delta-Ct)

Tabela 4. Efeito da Transformação. Avaliação dos genes de referência na comparação entre as plantas transformadas (vetor vazio pH7WG2D, codante do gene *GmHsp22.4* e do *GmHsp17.6B*) e as plantas não transformadas (amostras de controle, cultivar Williams 82 e cultivar PI595099).

Plantas transformadas		Plantas não-transformadas		Todas as plantas	
Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*	Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*	Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*
ELF1-B	1.86	ELF1-A	1.50	ELF1-A	1.50
ELF1-A	2.11	ELF1-B	1.86	ELF1-B	2.00
TUB	3.13	TUA	2.71	TUA	2.71
TUA	3.22	Beta-actina	3.83	Beta-actina	3.66
Beta-actina	3.34	TUB	4.43	TUB	4.43
RNAr18S	4.56	RNAr18S	4.73	RNAr18S	4.61
GAPDH	7.00	GAPDH	7.00	GAPDH	7.00

*Média geométrica dos valores de estabilidade dos programas utilizados pelo RefFinder (Genorm, NormFinder, BestKeeper e delta-Ct)

Tabela 5. Avaliação dos genes de referência na verificação do efeito da superexpressão dos genes *GmHsp22.4* e *GmHsp17.6B*

Superexpressão dos genes <i>GmHsp22.4</i> e <i>GmHsp17.6B</i>		Vetor vazio (pH7WG2D)		Todas as plantas transformadas	
Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*	Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*	Genes	Média Geométrica dos valores de classificação*
TUA	1.19	ELF1-A	1.50	ELF1-B	1.86
ELF1-B	1.68	ELF1-B	2.45	ELF1-A	2.11
ELF1-A	3.41	TUB	2.71	TUB	3.13
Beta-actina	4.40	Beta-actina	3.83	TUA	3.22
TUB	4.43	RNAr18S	3.98	Beta-actina	3.34
RNAr18S	4.56	TUA	4.00	RNAr18S	4.56
GAPDH	7.00	GAPDH	7.00	GAPDH	7.00

*Média geométrica dos valores de estabilidade dos programas utilizados pelo RefFinder (Genorm, NormFinder, BestKeeper e delta-Ct)

A análise do efeito da transformação da raiz com a *Agrobacterium rhizogenes* na estabilidade dos genes de referência, também revelou os genes *GmELF1- α* e o *GmELF1- β* como os mais estáveis (Tabela 4).

Outra comparação realizada visou verificar o efeito da superexpressão dos genes *GmHsp22.4* e *GmHsp17.6B*. Tais genes codificam as pequenas proteínas de choque térmico, sabidamente envolvidas na resposta de resistência a nematoides (LOPES-CAITAR et al., 2013). O perfil de expressão das raízes superexpressando esses genes foi comparado aos resultados das amostras transformadas apenas com o vetor pH7WG2D, além disso houve a comparação da análise utilizando todas as amostras provenientes da transformação. Os genes de referência comum entre todas as comparações e as mais estáveis foram *GmELF1- β* e *GmELF1- α* (Tabela 5).

Considerando os dados obtidos, conclui-se que o gene de referência *GmELF1- β* e o *GmELF1- α* estão entre os mais estáveis em todas as análises realizadas (comparação entre os tempos de exposição ao nematoide *M. javanica*, comparação entre raízes transformadas e não transformadas e na comparação quando há o efeito da superexpressão de genes) com as amostras transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* e o controle não transformado. Interessantemente, este gene também já foi descrito como um dos mais estáveis em soja em análises do perfil de expressão gênica de amostras obtidas em diferentes estágios de desenvolvimento, tecidos, genótipos e sob diferentes condições de fotoperíodo (HU

et al., 2009; JIAN et al., 2008). Similarmente, Nakayama et al. (2014), indicaram o gene GmELF1- β como um dos melhores normalizadores na validação de genes de referência em soja sob condições de hipóxia.

Em todas as análises deste trabalho, o gene GmGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato) foi identificado como um dos menos estáveis. Esse resultado é similar ao obtido por Stolf-Moreira et al. (2011), que selecionaram genes normalizadores em soja sob estresse hídrico. Assim como Expósito-Rodríguez et al. (2008), que identificaram este gene como um dos mais instáveis na validação de gene de referência para análises em amostras de tomate, em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento.

O gene GAPDH está envolvido em diversas funções celulares; além de sua principal atividade na via glicolítica na etapa de conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato (SUZUKI; HIGGINS; CRAWFORD, 2000), este gene também está envolvido na exportação do RNA nuclear, na replicação e reparação de DNA, fusão de membranas excitotática, organização do exoesqueleto, na atividade fosfotransferase (BUSTIN, 2002; SIROVER, 1999) e na ativação da transcrição (ZHENG; ROEDER; LUO, 2003).

Desse modo, embora o gene GAPDH tenha expressão na maioria dos tipos celulares e aparentemente estável, os dados obtidos neste trabalho e algumas descrições na literatura, não indicam seu uso como um gene de expressão constitutiva em ensaios altamente sensíveis, como a metodologia de RT-qPCR, onde variações mínimas na expressão podem ser detectadas. Em alguns casos esse gene pode ser utilizado, mas é uma exceção (BUSTIN, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho se basearam na análise conjunta dos diferentes programas BestKeep, GeNorm, Normfinder e pelo método de comparação de Δ -Ct, utilizando o programa RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). Apesar de apresentarem uma classificação parecida, com pelo menos os mesmos três genes indicados como mais estáveis, em nenhuma das ocasiões o ordem de classificação destes foi igual (Figura 6, 7 e 8).

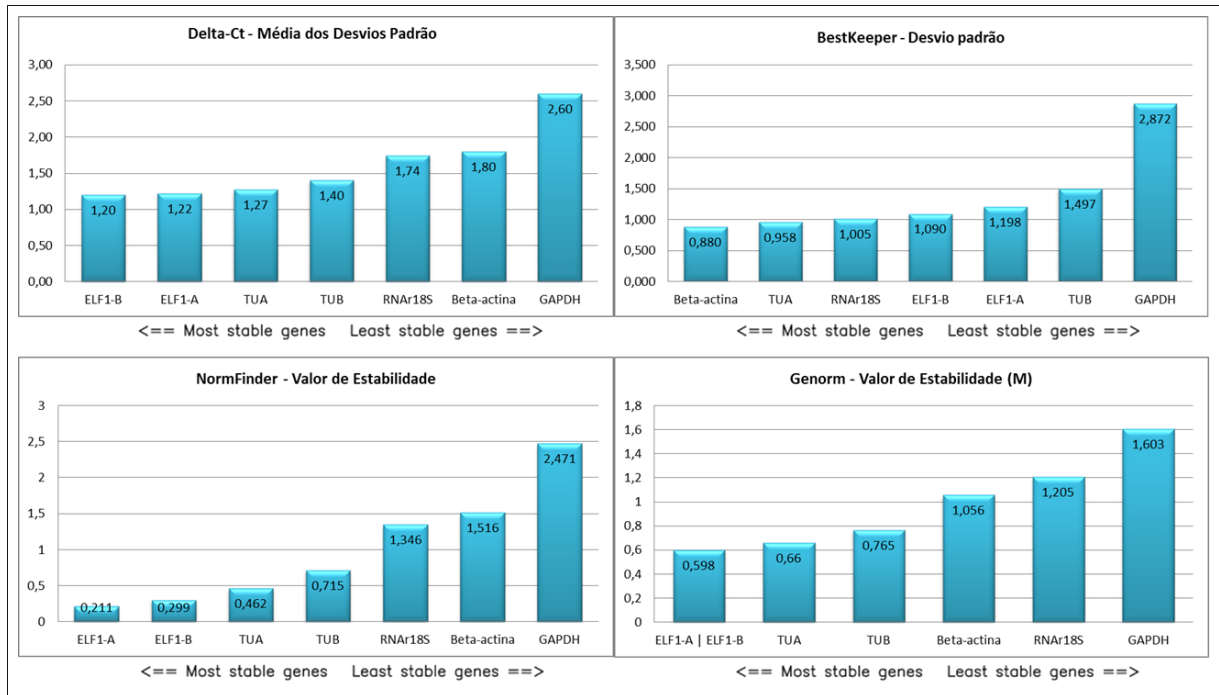


Figura 6. Classificação dos genes de referência das amostras nos diferentes modelos matemáticos para os tempos combinados de 8 e 50dpi, na análise realizada pelo programa RefFinder.

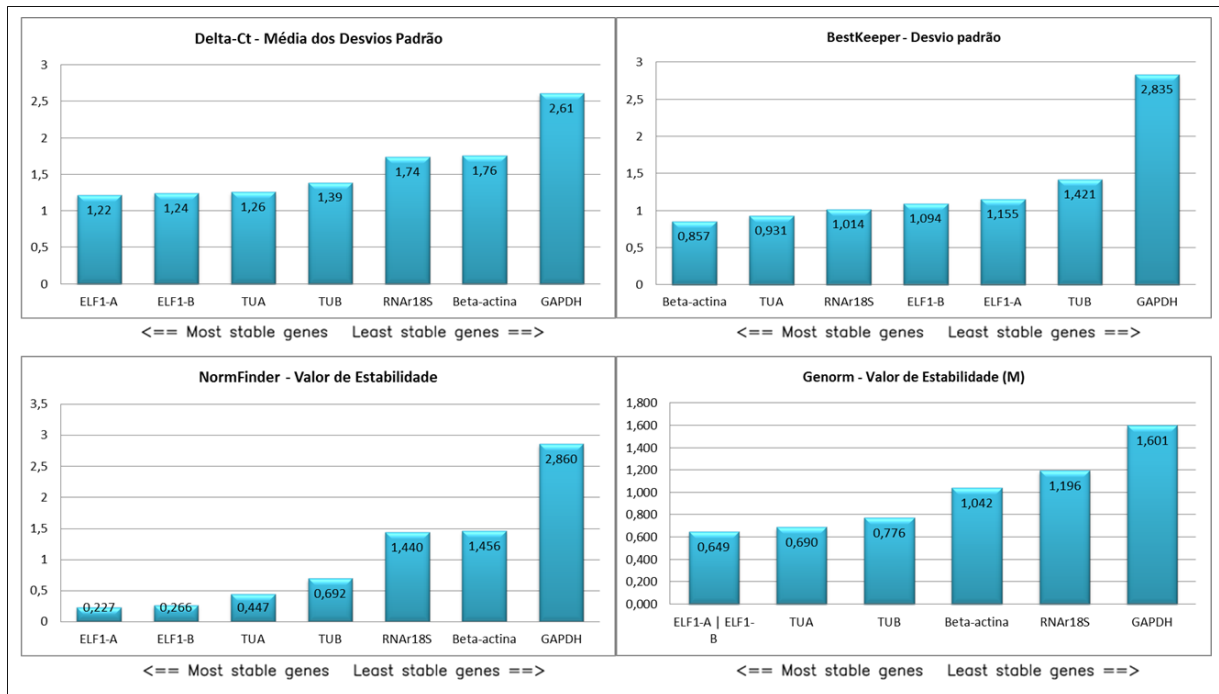


Figura 7. Classificação dos genes de referência das amostras nos diferentes modelos matemáticos para a avaliação do efeito da transformação, todas as amostras de plantas transformadas e não transformadas juntas, na análise realizada pelo programa RefFinder

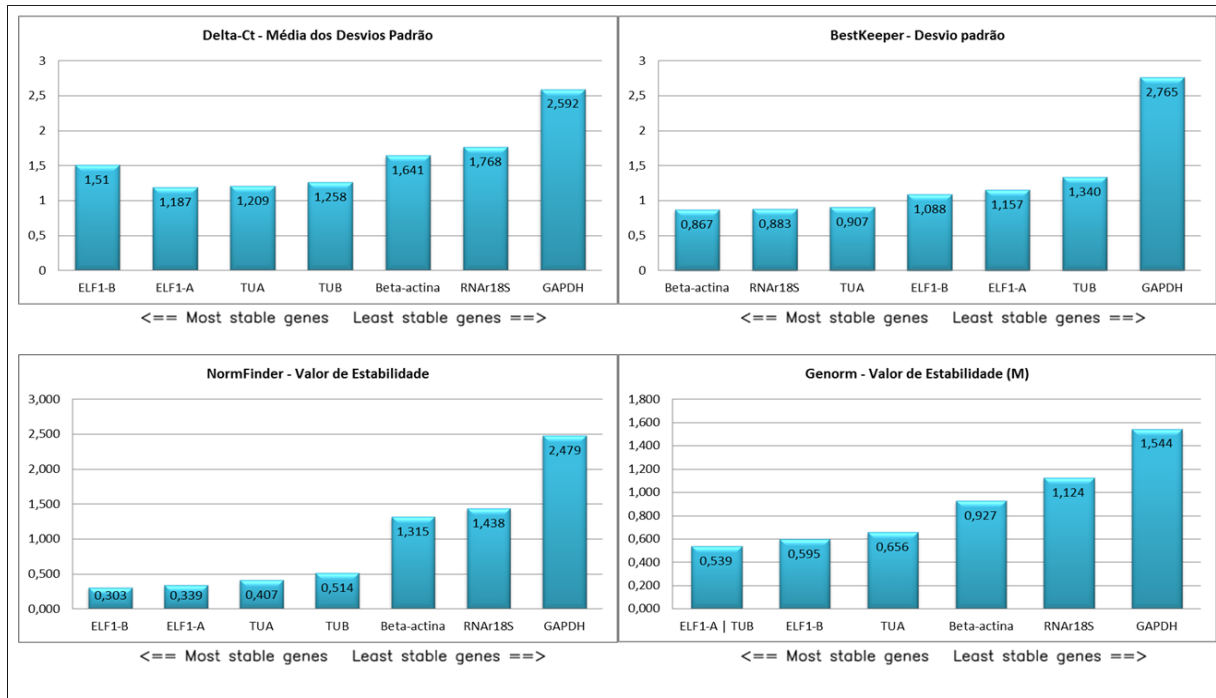


Figura 8. Classificação dos genes de referência das amostras nos diferentes modelos matemáticos para todas as amostras transformadas, na análise realizada pelo programa RefFinder.

Provavelmente, isso ocorre devido a diferença entre os modelos matemáticos utilizados. O BestKeeper utiliza os valores de Ct obtidos de forma direta para determinação do desvio padrão e coeficiente de variação, indicando como o gene mais estável aquele que apresentar menor variação (PFAFFL et al., 2004). O NormFinder utiliza um modelo matemático para estimar a variação de expressão dos genes candidatos de forma intra e intergrupar. Após a estimativa das expressões é realizado um cálculo para estabelecer um valor de estabilidade para cada gene analisado. Esse modelo seleciona os genes com o perfil de expressão mais estável em todo um conjunto de amostras (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004). O Genorm determina os melhores normalizadores baseado na comparação de cada gene de controle interno em pares – um gene é comparado com cada um dos outros genes analisados – onde é calculado o desvio padrão entre as taxas de expressão, em escala logarítmica. Ao final, cada gene de referência apresenta uma medida M, média aritmética dos desvios-padrão de um determinado gene (VANDESOMPELE et al., 2002). Finalmente, o método de comparação do Δ -Ct é baseado no método do programa Genorm, desenvolvido por Vandesompele et al. (2002), no qual há comparação direta entre os valores Ct de par em par dos genes candidatos e o respectivo desvio padrão do Δ -Ct (SILVER et al., 2006).

De modo similar, nos vários trabalhos em que a validação de genes normalizadores utiliza mais de um programa, foi possível verificar uma diferença na classificação obtida em cada um deles. Wan et al. (2010) avaliou genes normalizadores para o estudo de estresses bióticos, abióticos e para tratamentos hormonais em pepinos, obtendo como melhores normalizadores para análise do “pool” de amostras, os genes ACT e o ACT3 (actina), pelo programa Genorm, enquanto o Programa NormFinder indicou a UBI-ep (ubiquitina proteína de extensão) e o ELF1- α (Fator de alongamento); na análise pelo Genorm esses dois genes foram menos estáveis do que o ACT e ACT3, apesar de apresentarem boa estabilidade. Miranda et al. (2013) trabalhando na identificação de genes de referencia para estudo com plântulas de soja em diferentes estágios de desenvolvimento, durante a infestação da folha com lagarta *A. gemmatalis*, obtiveram os genes CYP2 e o ELF1- α como mais estáveis pelos programas Genorm e NormFinder, porém durante a infecção da raiz com o nematoide de galha *M. Incógnita*, obteve os genes ELF1- α e TUA pelo programa Genorm e os genes ELF1- α e ACT11 pelo NormFinder como os melhores normalizadores. Finalmente Li et al, (2012), obteve pelo Programa Genorm os genes Glyma08g28550 e Glyma05g27480 como melhores normalizadores para estudo de genes em soja em diferente estágio de desenvolvimento e germinação de sementes, no entanto o Programa NormFinder indicou os genes UKN2 e Glyma05g37470.

3.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, plantas de soja compostas foram produzidas via transformação com *Agrobacterium rhizogenes*, e as raízes transformadas foram infectadas com o nematoide *Meloidogynes javanica*. Para a escolha dos genes normalizadores para análises de expressão genica via RT-qPCR foram realizadas comparações a fim de testar o efeito do tempo de inoculação com o patógeno em raízes transgênicas (8 e 50 dias), efeito de cada gene *Hsp20* (amostras transformadas apenas com o vetor vazio e com construções de genes de interesse) e o efeito da transformação (comparação entre as amostras de raízes transformadas e não transformadas). Nessas comparações os genes de referência que se

apresentaram mais estáveis em todas as análises foram o GmEFL1- β , o mesmo gene identificado em validações de genes de referencia em amostras de soja na avaliação de em diferentes estágios de desenvolvimento, tecidos, cultivares e sob diferentes condições de fotoperíodo (HU et al., 2009) e em amostras sob condições de hipóxia (NAKAYAMA et al., 2014), e o GmELF1- α .

Além disso, o gene GmGADPH foi identificado como o menos estável entre os genes analisados, assim como ocorreu no trabalho de Stolf-Moreira et al. (2011), que selecionou genes de referencia em soja com estresse a seca.

REFERÊNCIAS

ALPIZAR, E. et al. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant cell reports**, v. 25, n. 9, p. 959–67, set. 2006.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer research**, n. 64, p. 5245–5250, 2004.

BERNARD, P. Positive selection of recombinant DNA by CcdB. **BioTechniques**, v. 21, n. 2, p. 320–323, ago. 1996.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 553, 1981.

BORGES, A.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant cell reports**, v. 31, n. 5, p. 827–38, maio 2012.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, n. 29, p. 23–39, 2002.

COLLIER, R. et al. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 43, n. 3, p. 449–57, ago. 2005.

DEKKERS, B. J. W. et al. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. **Plant & cell physiology**, v. 53, n. 1, p. 28–37, jan. 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC plant biology**, v. 8, p. 131, jan. 2008.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental cell research**, v. 158, n. 9901, p. 151–158, 1968.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M. et al. High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. **BMC plant biology**, v. 10, n. 1, p. 237, jan. 2010.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC molecular biology**, v. 10, p. 93, jan. 2009.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–84, jun. 2005.

IBRAHIM, H. M. M. et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 90–9, jan. 2011.

JIAN, B. et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 9, p. 59, jan. 2008.

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.

LE, D. T. et al. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e46487, jan. 2012.

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, J.-F. et al. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. **Plant methods**, v. 5, n. 6, p. 1–15, jan. 2009.

LI, Q. et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant cell reports**, v. 31, n. 10, p. 1789–98, out. 2012.

LIBAULT, M. et al. Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. **The Plant Genome Journal**, v. 1, n. 1, p. 44, 2008.

LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. **Analytical biochemistry**, v. 302, n. 1, p. 52–9, 1 mar. 2002.

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. 577, p. 1–17, jan. 2013.

MIRANDA, V. D. J. et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC research notes**, v. 6, p. 196, jan. 2013.

MOHAMMADI-DEHCHESHMEH, M. et al. A novel method based on combination of semi-in vitro and in vivo conditions in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of *Glycine* species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 2, p. 282–291, 21 nov. 2013.

MULLER, P. Y. et al. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. **BioTechniques**, v. 32, n. 6, 2002.

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

NAKAYAMA, T. J. et al. Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 860–871, 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 6, p. 509–15, mar. 2004.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36, 1 maio 2002.

RAHMAN, S. A. S. A. et al. In planta PCR-based detection of early infection of plant-parasitic nematodes in the roots: a step towards the understanding of infection and plant defence. **European Journal of Plant Pathology**, v. 128, n. 3, p. 343–351, 9 jul. 2010.

REBOUÇAS, E. DE L. et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 143–154, 2013.

SCHMITTGEN, T. D. et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Analytical biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 194–204, 15 out. 2000.

SCHMITTGEN, T.; ZAKRAJSEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 46, p. 69–81, 2000.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 7, n. 33, jan. 2006.

SIROVER, M. A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1432, n. 2, p. 159–184, jul. 1999.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 58–65, 2011.

SUZUKI, T.; HIGGINS, P.; CRAWFORD, D. Control selection for RNA quantitation. **Biotechniques**, v. 29, n. 2, p. 332–337, 2000.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 291–295, out. 1999.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

VOINNET, O. et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 33, n. 5, p. 949–56, mar. 2003.

WAN, H. et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical biochemistry**, v. 399, n. 2, p. 257–61, 15 abr. 2010.

WANG, Y. et al. Selection of reference genes for normalization of qRT-PCR analysis of differentially expressed genes in soybean exposed to cadmium. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 2, p. 1585–94, fev. 2012.

WEBER, R. L. M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1070–1075, 2011.

ZHENG, L.; ROEDER, R. G.; LUO, Y. S Phase Activation of the Histone H2B Promoter by OCA-S, a Coactivator Complex that Contains GAPDH as a Key Component. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 255–266, jul. 2003.