



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Vívian de Jesus Miranda

**Caracterização da expressão do gene codificador da enzima de  
conjugação a ubiquitina (E2) em soja inoculada com *Meloidogyne  
incognita* e infestada com *Anticarsia gemmatalis***

Orientador: Rodrigo da Rocha Fragoso

Coorientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília, DF

2011

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Caracterização da expressão do gene codificador da enzima de  
conjugação a ubiquitina (E2) em soja inoculada com *Meloidogyne  
incognita* e infestada com *Anticarsia gemmatalis***

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Departamento de Biologia Celular do Instituto  
de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Biologia Molecular

Orientador: Rodrigo da Rocha Fragoso  
Coorientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília, DF

2011

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dra. Idilnete Silva Pereira (Universidade de Brasília – Membro da banca)

Prof. Dr. David John Bertioli (Universidade de Brasília / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Membro da banca)

Prof. Dr Osmundo Brilhante (UniEURO / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Suplente)

Trabalho desenvolvido no  
Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga  
da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Laboratório  
de Virologia da Embrapa Cerrados

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Glória e Vicente, que sempre me deram suporte em todas as minhas metas, e ao Marco, que foi o meu porto seguro durante esses dois anos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu orientador, amigo e exemplo de pessoa Rodrigo da Rocha Fragoso, por toda orientação, paciência, confiança, amizade e diversão no trabalho (momentos de *Rallye Dakar* para fazer a coleta no dia certo). Agradeço por ter me direcionado desde o final da graduação e por ter me introduzido no mundo acadêmico de uma forma super estimulante.

À Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, pela oportunidade que me deu de participar de sua equipe maravilhosa de trabalho e por ter me confiado todos os trabalhos referentes ao promotor UceS8.3.

Ao Dr. Waldir Pereira Dias, da Embrapa Soja, por ter cedido sementes de soja, cv. Santa Rosa e inóculo de *Meloidogyne incognita*.

À Dra. Regina Carneiro, por me acompanhar nas etapas iniciais do trabalho com o nematoide *M. incognita*.

Ao casal nota dez (Roberta e Dijair Júnior), por toda ajuda que me deram, tanto no trabalho (manipulando as nervosas *A. gemmatilis*) quanto nas conversas, conselhos e distrações.

À equipe de soja do LIMPP (Regina, Maria Eugênia e André), pelas inúmeras discussões sobre os experimentos com soja e por toda ajuda direta ou indireta no trabalho.

Ao Dr. Osmundo Brilhante, pelo apoio que sempre deu ao meu trabalho e pela diversão que proporciona no laboratório. Você faz o ambiente de trabalho ficar sempre auto-astral.

Aos meus queridos amigos Angelina e Tiago que estão sempre me apoiando e incentivando em tudo que me proponho a fazer. Vocês moram dentro do meu coração!

À minha querida família (Glória, Vicente, Gil, Teliane, Vanessa, Letícia, Davi e Marco), pelo apoio incondicional em todos os momentos. Por suportar todo o estresse, tensão e ausência durante esses dois anos.

À minha amiga Lecir, por ter me auxiliado na compra dos reagentes deste trabalho e por todas as conversas, conselhos, piadas e tapas no braço que me deu durante esses dois anos.

A todos os amigos do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (Fernando, Firmino, Bruna, Antônio Américo, Raquel, Dudu, Flavuca, Carol, Léo, Edilson, Wagner, Thales Rocha, Cristina Mattar, Sineide, Sheisca e etc.), que de uma forma ou de outra contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Enfim, a Deus, que me concedeu a graça de ter saúde e pela possibilidade de realização deste sonho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 – A cultura da soja .....	1
1.2 – Pragas da soja e medidas de controle .....	2
1.3 – Utilização de promotores na transformação genética de plantas .....	5
1.4 – Introdução à proteólise .....	7
1.4.1 – Modificação de proteínas pela adição de ubiquitina .....	8
1.4.2 – Degradação de proteínas mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma .....	8
1.4.3 – Enzimas da via ubiquitina-proteassoma .....	11
1.4.4 – Via ubiquitina proteassoma e estresse biótico em plantas .....	11
1.5 – Análise da expressão gênica utilizando PCR em tempo real .....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 – Objetivo geral .....	15
2.2 – Objetivos específicos .....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 – Materiais .....	16
3.1.1 – Cultivar de soja .....	16
3.1.2 – Obtenção dos patógenos para utilização nos bioensaios com soja .....	16
3.1.3 – Amostras utilizadas para análise da expressão gênica .....	17
3.1.4 – Kits e reagentes utilizados .....	18
3.1.5 – Oligonucleotídeos .....	18
3.1.6 – Ferramentas de bioinformática .....	18
3.2 – Métodos .....	19
3.2.1 – Coleta de tecidos de soja em diferentes estádios do desenvolvimento .....	19
3.2.2 – Bioensaio de soja infectada com o nematoide <i>M. incognita</i> .....	20
3.2.3 – Coloração de nematoides em raiz de soja utilizando fucsina ácida .....	21
3.2.4 – Bioensaio de soja submetida à desfolha por <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	21
3.2.5 – Análise <i>in silico</i> do padrão expressão dos genes referência em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
3.2.6 – Análise do padrão expressão do gene <i>E2</i> em soja .....	22
3.2.7 – Análise filogenética de proteínas UBC .....	23
3.2.8 – Análise de prováveis <i>cis</i> -elementos no promotor UceS8.3 .....	24

3.2.9 – Extração de RNA total (Método Trizol) .....	24
3.2.10 – Reação de transcrição reversa .....	25
3.2.11 – Validação dos cDNAs obtidos por RT-PCR .....	25
3.2.12 – Análise da expressão gênica por qRT-PCR .....	26
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 – Obtenção de amostras de soja para a determinação do perfil de expressão espacial e temporal do gene <i>E2</i> .....	27
4.2 – Bioensaio de soja infectada pelo nematoide <i>M. incognita</i> .....	28
4.3 – Bioensaio de soja submetida à desfolha por <i>A. gemmatalis</i> .....	30
4.4 – PCR quantitativo .....	31
4.4.1 – Genes de referência em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento da soja .....	32
4.4.2 – Genes de referência em galhas de soja infectada pelo nematoide <i>M. incognita</i> .....	36
4.4.3 – Genes de referência em folha de soja submetida ao ataque da lagarta-da-soja ( <i>A. gemmatalis</i> ) .....	38
4.4.4 – Expressão relativa do gene <i>RB7</i> para validação dos genes referência selecionados .....	39
4.5 – Análise espacial e temporal da expressão de <i>E2</i> em soja .....	40
4.6 – Análise da expressão de <i>E2</i> em galhas de soja submetida à infecção por <i>M. incognita</i> .....	42
4.7 – Análise da expressão de <i>E2</i> em folha de soja submetida ao ataque da lagarta-da-soja ( <i>A. gemmatalis</i> ) .....	45
4.8 – Análise de prováveis <i>cis</i> -elementos no promotor UceS8.3 .....	46
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 – Validação de genes referência .....	51
5.2 – Análise da expressão do gene <i>E2</i> controlado pelo promotor UceS8.3 .....	53
5.3 – Análise <i>in silico</i> do padrão expressão do gene <i>E2</i> em soja .....	58
5.4 – Análise filogenética de proteínas UBCs .....	59
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>77</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais pragas e doenças da soja em relação à fenologia .....	3
<b>Figura 2.</b> A maquinaria do sistema ubiquitina-proteassoma .....	9
<b>Figura 3.</b> Estádios fenológicos da soja .....	27
<b>Figura 4.</b> RNA total extraído de diferentes tecidos de plantas de soja em diferentes estádios de desenvolvimento .....	28
<b>Figura 5.</b> Progresso da infecção por nematoides ( <i>M. incognita</i> ) de galha em raízes de soja susceptível .....	29
<b>Figura 6.</b> RNA total extraído de raiz infectada por <i>M. incognita</i> .....	29
<b>Figura 7.</b> Bioensaio de soja com lagartas de quarto ínstar de <i>A. gemmatalis</i> .....	30
<b>Figura 8.</b> RNA total extraído de folha submetida ao ataque de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Perfil transcricional dos genes de referências com valores absolutos de <i>Ct</i> para todas as amostras analisadas .....	31
<b>Figura 10.</b> Curva de dissociação da amplificação dos genes estudados .....	32
<b>Figura 11.</b> Valor de estabilidade de expressão dos genes estudados gerado pelo programa geNorm .....	34
<b>Figura 12.</b> Variação par a par dos genes de referência candidatos gerados pelo programa geNorm .....	36
<b>Figura 13.</b> Valor de estabilidade de expressão dos genes estudados para raiz de soja inoculada com o nematoide <i>M. incognita</i> gerado pelo programa geNorm .....	38
<b>Figura 14.</b> Valor de estabilidade de expressão dos genes estudados para folha submetida ao ataque de lagarta-da-soja gerado pelo programa geNorm .....	39
<b>Figura 15.</b> Quantificação relativa do gene <i>RB7</i> utilizando os genes referência selecionados para a normalização .....	40
<b>Figura 16.</b> Análise espacial e temporal da expressão de <i>E2</i> pelo programa qBASE plus .....	41
<b>Figura 17.</b> Análise espacial e temporal da expressão relativa do gene <i>RB7</i> específico de raiz pelo programa qBASE plus .....	42
<b>Figura 18.</b> Análise da expressão relativa de <i>E2</i> em raiz de soja infectada pelo nematoide <i>M. incognita</i> pelo programa qBASE plus .....	43

<b>Figura 19.</b> Análise da expressão relativa do gene <i>RB7</i> em raiz de soja infectada pelo nematoide <i>M. incognita</i> pelo programa qBASE plus .....	44
<b>Figura 20.</b> Análise da expressão relativa do gene <i>CYP2</i> em raiz de soja infectada pelo nematoide <i>M. incognita</i> pelo programa qBASE plus .....	45
<b>Figura 21.</b> Análise da expressão relativa do gene <i>E2</i> em folha submetida ao ataque da lagarta-da-soja ( <i>A. gemmatalis</i> ) pelo programa qBASE plus .....	46
<b>Figura 22.</b> Análise do promotor UceS8.3 através dos bancos PLACE e PLANTCARE .....	48
<b>Figura 23.</b> Análise filogenética dos membros da superfamília E2 .....	60

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Cultivares de soja ( <i>Glycine max</i> ) utilizadas nos experimentos de qRT-PCR .....	16
<b>Tabela 2.</b> Conjunto de tecidos/tratamentos utilizados para a análise da expressão gênica ...	17
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real .....	18
<b>Tabela 4.</b> Genes utilizados para a análise de expressão gênica em soja .....	22
<b>Tabela 5.</b> Estabilidade de expressão dos genes referência calculado pelo programa NormFinder .....	35
<b>Tabela 6.</b> Padrão de expressão de <i>E2</i> obtido a partir das bibliotecas subtrativas presentes no banco GENOSOJA .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA – Ácido Abscísico

AMV - Alfalfa Mosaic Vírus

CaMV – Cauliflower Mosaic Virus

cDNA – DNA complementar

*Ct* – *Cycle Threshold*

d.a.i – dias após a inoculação

DUB – Enzimas desubiquitinases

dsRNA – double-stranded RNA

E1 – Enzima de ativação a ubiquitina

E2 – Enzima de conjugação a ubiquitina

E3 – Enzima ligase de ubiquitina

FN – Fator de Normalização

GUS – enzima  $\beta$ -glucuronidase

HECT – *Homologous to the E6 associated protein carboxyl*

MeJA – Metil jasmonato

*N-end* – amino terminal de uma proteína

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RING – *Really Interesting New Gene*

RT-PCR – Transcriptase Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase

R2 – Estádio Reprodutivo 2

R4 – Estádio Reprodutivo 4

TFs – Transcription factors

*uidA* – gene codificador da enzima  $\beta$ -glucuronidase

V4 – Estádio Vegetativo 4

5'UTR – 5' Untranslated Region

## RESUMO

A soja é uma cultura de grande importância econômica no Brasil. No entanto, vários fatores bióticos afetam sua produtividade. Entre esse fatores destacam-se os danos causados por insetos-praga, como lagartas desfolhadoras e por fitonematóides. Várias estratégias envolvendo transgenia têm sido desenvolvidas para o controle de pragas e doenças, sendo importante o uso de promotores gênicos capazes de direcionar a expressão de transgenes nos tecidos atacados, atingindo níveis adequados para desencadear a proteção vegetal. Vários trabalhos sugerem um importante papel da via ubiquitina-proteassoma ao longo do desenvolvimento das plantas, assim como em resposta a estresses bióticos. Particularmente, genes codificadores de enzima de conjugação a ubiquitina (*E2*) mostraram ser ativados em sítio de alimentação de *Meloidogyne incognita* e em resposta ao ataque de insetos. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo determinar o perfil de expressão transcricional do gene *E2* em diferentes tecidos de soja, em diferentes fases do desenvolvimento, em raízes inoculadas com *M. incognita* e folhas infestadas por *Anticarsia gemmatalis*, pela técnica de qRT-PCR, como caracterização de promotor cognato UceS8.3, previamente isolado e patenteado. Para a normalização do gene *E2* nos experimentos de qPCR, oito genes de referência clássicos foram selecionados e validados quanto a sua estabilidade de expressão nas diferentes condições experimentais analisadas. Os melhores genes de referência foram utilizados na quantificação dos níveis do transcrito do gene *E2*. O acúmulo de transcritos de *E2* foi determinado espacial e temporalmente, nos órgãos de raiz, caule, folha, flor e vagem, nos fases de desenvolvimento (V4, R2 e R4). Foi observado que ocorre acúmulo de transcritos de *E2* em R4, provavelmente relacionado a senescência da planta. Em seguida, bioensaios foram conduzidos em raízes de soja inoculadas com juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, e em folhas infestadas com lagartas de quarto ínstar de *A. gemmatalis*. Nas interações com nematóide e com insetos, foi detectado acúmulo de transcritos de *E2* de 2 a 6 vezes. Paralelamente, o banco de bibliotecas subtrativas GENOSOJA foi utilizado para verificar acúmulo de transcritos de *E2* em resposta a estresses (bióticos e abióticos). As análises *in silico* mostraram que o gene *E2* é mais abundante em resposta a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, ao fungo *Phakopsora pachyrhizi* e ao estresse hídrico. Os resultados obtidos de quantificação de transcritos de *E2* e da análise *in silico* foram relacionados a *cis*-elementos presentes na região regulatória, e indicam que o promotor UceS8.3 representa uma importante ferramenta biotecnológica para obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a fitonematóides, doenças fúngicas, insetos desfolhadores e/ou deficiência hídrica.

**Palavras chave:** *Glycine max*, *Meloidogyne incognita*, *Anticarsia gemmatalis*, promotor, enzima de conjugação a ubiquitina, PCR em tempo real

## ABSTRACT

Soybean is a crop of great economic importance in Brazil. However, several biotic factors have been affecting soya productivity. Among them, the damage caused by insect pests such as defoliating caterpillars and plant nematodes. Several strategies involving transgenic plants have been developed to control pests and diseases, being important the utilization of gene promoters capable of driving transgene expression in tissues attacked, at appropriate levels to trigger plant protection. Several studies suggest an important role of ubiquitin-proteasome pathway during plant development and in plant responses to biotic stresses. Particularly, genes encoding ubiquitin conjugation factors (E2) have been shown to be activated in feeding sites of *Meloidogyne incognita* and in response to insect attack. In this context, this study aims to determine the accumulation of the *E2* transcripts considering different tissues of soybean, different stages of development, roots inoculated with *M. incognita* and leaves infested with *Anticarsia gemmatalis*, by qRT-PCR technique in order to further characterize its cognate promoter (UceS8.3). Aiming *E2* gene normalization in qPCR experiments, eight classical reference genes were selected and validated for their expression stability. The best reference genes were used in the normalization of the *E2* gene. To characterize the spatial and temporal accumulation of *E2* transcripts, samples of root, stem, leaf, flower and pod were collected at three different developmental stages (V4, R2 and R4). It was found that *E2* transcripts accumulated in R4, probably related to senescence process. Thus, bioassays were conducted in soybean roots inoculated with second stage juveniles (J2) of *M. incognita*, and leaves infested with fourth instar larvae of *A. gemmatalis*. Considering the nematode and caterpillars interactions, it was detected an *E2* transcripts accumulation of 2 to 6 times. Parallely, the subtractive libraries bank GENOSOJA was used to verify the accumulation of *E2* transcripts in response to other stresses (biotic and abiotic). *In silico* analysis showed that the *E2* gene is more abundant in response to *Bradirhizobium japonicum* bacteria, *Phakopsora pachyrhizi* fungal, and to drought stress. The results were related to *cis-elements* present in the regulatory region, and suggested that the UceS8.3 promoter represents an important biotechnological tool to genetic modified plant generation resistant to plant nematodes, fungal diseases, defoliating insects and/or hydric deficit.

**Keywords:** *Glycine max*, *Meloidogyne incognita*, *Anticarsia gemmatalis*, promoter, ubiquitin conjugating enzyme, Real-Time PCR

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 – A cultura da soja

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma espécie Paliotetraploide ( $2n=40$ ), pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine*, subgênero *Soja*. Sua origem se deu há pelo menos cinco mil anos na costa leste da Ásia, na China, sendo espalhada pelo mundo por intermédio de viajantes ingleses e por imigrantes japoneses e chineses (EMBRAPA, 2004). No Brasil, a soja chegou via Estados Unidos em 1882 e foi inicialmente plantada, por algumas instituições de pesquisa, como uma cultura forrageira, e só alguns anos depois foi utilizada na produção de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais (MISSÃO, 2006). Ela é uma das espécies vegetais mais importantes devido ao alto teor de óleo e proteína nas sementes e por sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico por meio de simbiose com micro-organismos no solo (SCHMUTZ et al., 2010). Entre as principais formas de utilização da soja, destaca-se o consumo de grãos na alimentação humana (produção de leite de soja, sobremesas, tofu e molho para saladas), a utilização do farelo em rações de animais (devido ao alto teor proteico) e a utilização do óleo na fabricação do biodiesel (MISSÃO, 2006).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, além de estar entre os maiores exportadores de grão, farelo e óleo. Essa cultura tem se consolidado como a principal cultura do agronegócio brasileiro desde 2004, quando o Brasil produziu 50 milhões de toneladas de grãos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (REETZ et al., 2008). A partir daí, a cultura esteve em constante crescimento. Atualmente, o Brasil é responsável por mais de 26% da produção mundial e um terço das vendas globais da oleaginosa (USDA, 2010). No final dos anos 70, mais de 80% da produção de soja brasileira se concentrava basicamente na região Sul, sendo inicialmente expandida para a região Centro-Oeste. Hoje os maiores estados produtores de soja, em ordem decrescente, são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia e São Paulo, sendo somente os três primeiros responsáveis por mais de 60% da produção brasileira (DESENBAHIA, 2009).

## 1.2 – Pragas da soja e medidas de controle

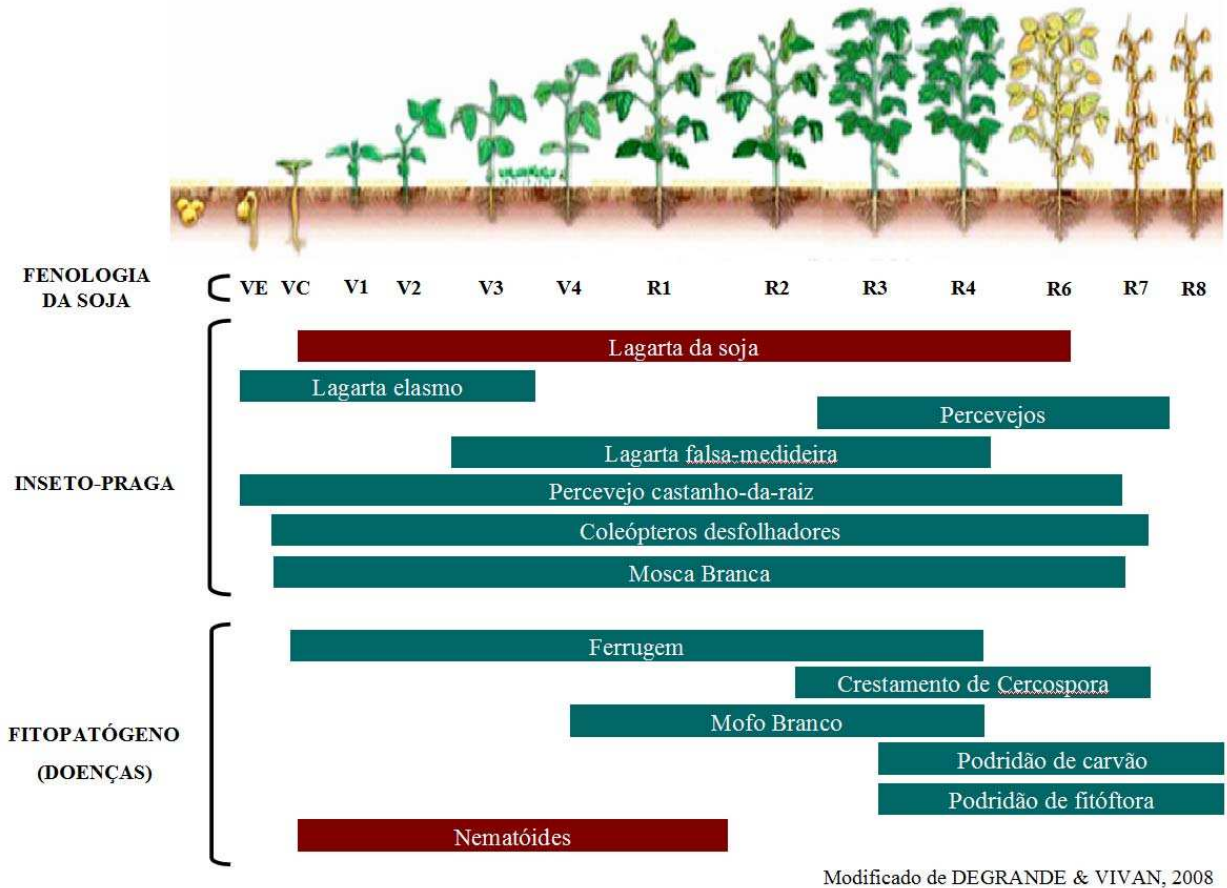
Apesar do crescimento da cultura de soja, muitos fatores bióticos, como o ataque de insetos-praga e doenças, têm condicionado o rendimento de grãos de soja durante todo o seu ciclo. Entre as principais pragas da soja estão: as lagartas desfolhadoras (Lagarta-da-soja - *Anticarsia gemmatalis* e a lagarta falsa medideira - *Pseudoplusia includens*), que se alimentam das folhas jovens, causando redução da área foliar e da taxa fotossintética, principalmente entre os estádios vegetativo-cotiledonar (VC) e estágio reprodutivo (R6); e os percevejos (Percevejo marrom - *Euschistus heros*, Percevejo verde pequeno - *Piezodorus guildinii* e Percevejo verde - *Nezara viridula*), responsáveis pela redução no rendimento e na qualidade das sementes, causada diretamente pelas picadas ou indiretamente pela inoculação de patógenos nas feridas, ocorrendo frequentemente após o estágio reprodutivo R2 até a maturação da planta (DEGRANDE e VIVAN, 2008) (Figura 1).

Entre as doenças que atacam a soja, destacam-se as doenças fúngicas, sendo a ferrugem “asiática” a principal doença devido aos danos à cultura, e as doenças causadas por nematoides fitoparasitas do solo (BARROS, 2008) (Figura 1). No Brasil, há seis espécies de nematoides que causam severos danos à lavoura: o nematoide de cisto (*Heterodera glycines*), três espécies de nematoide de galha (*Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne arenaria*), o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) e o nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*). Apesar de não causar perdas comparáveis às dos nematoides de cisto, os nematoides das lesões radiculares têm causado uma grande preocupação ao sojicultor no Brasil (INOMOTO et al., 2010). Entretanto, os nematoides do gênero *Meloidogyne*, com as espécies de *M. incognita* e *M. javanica* causam severos danos, não somente à cultura da soja, mas a várias culturas no Brasil e no mundo. A ocorrência de *M. javanica* é generalizada, sendo encontrado nas principais regiões produtoras (PR, SP, MG, MS, MT, BA); já *M. incognita* predomina em áreas cultivadas anteriormente com café ou algodão (TORRES et al., 2008).

O gênero *Meloidogyne* foi relatado como causador de perdas na cultura de soja de cerca de 10 a 40% em solos arenosos ou médio-arenosos (INOMOTO et al., 2010). Esses nematoides formam reboleiras nas lavouras, que podem ser vistas como manchas na plantação onde as plantas ficam pequenas e amareladas, ou até mortas. O juvenil de segundo estágio (J2) invade as pontas das raízes e migra pelos tecidos radiculares para então modificar células do cilindro vascular, formando o sítio de alimentação, estrutura composta de 3-5 células gigantes (GHEYSEN e FENOLL, 2002; VAN DER EYCKEN et al., 1996). Quando em



condições favoráveis, ocorre diferenciação em fêmea adulta, completando seu ciclo em menos de um mês ao depositar em torno de 2.000 ovos (CAMPOS, 1999).



**Figura 1.** Principais pragas e doenças da soja em relação à fenologia, com modificações (DEGRANDE e VIVAN, 2008).

As práticas culturais e o manejo de pragas e doenças da soja têm sido desenvolvidos e aplicados. Entretanto, observa-se em alguns casos um sucesso limitado e um alto custo, sendo o cultivo de variedades resistentes a forma mais eficiente e economicamente viável. Existe então uma grande expectativa que estratégias moleculares possam ser aplicadas em conjunto com as práticas agrônômicas atuais, visando à seleção de variedades resistentes por melhoramento genético, ou a geração de plantas geneticamente modificadas com alta resistência a pragas. Considerando as plantas GM resistentes à insetos já no mercado, foram observadas vantagens como: aumento de produtividade, diminuição dos desmatamentos para a expansão de área cultivada, diminuição dos custos de produção e da poluição ambiental ocasionada pela redução na aplicação de produtos químicos na lavoura (JAMES, 2007).

Várias estratégias de engenharia genética têm sido testadas para o controle de pragas da soja, como a transformação genética de plantas com genes de inibidores enzimáticos (proteases e  $\alpha$ -amilase) e genes codificadores de toxinas Cry de *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) para o controle de insetos-praga (KHADEEVA et al., 2009; STEWART et al., 1996; WANG et al., 2004). Recentemente, a estratégia de silenciamento gênico, por interferência mediada por RNA dupla fita, tem se mostrado muito promissora para o controle de nematoides (MCCARTER, 2008). Tal estratégia se baseia na transformação de plantas para que expresse RNA dupla fita, com sequência específica de genes-alvo do fitonematoide. Podem ser considerados como genes-alvo os genes essenciais ao fitonematoide ou genes envolvidos com o parasitismo, migração, formação ou manutenção do sítio de alimentação (MCCARTER, 2008). Durante o ciclo dos nematoides, estes ingerem o conteúdo citoplasmático das células gigantes de raízes infectadas, provocando a absorção do dsRNA, o que pode resultar no silenciamento do gene correspondente. Conforme a função do gene silenciado, inúmeras disfunções podem ser geradas no fitonematoide pelo nocaute gênico ou redução da expressão de genes específicos, de forma que a infecção pode ser abortada.

Em qualquer abordagem envolvendo expressão heteróloga de genes em plantas geneticamente modificadas, se faz necessário à utilização de promotores (sequências regulatórias da expressão gênica) capazes de direcionar a expressão dos transgenes nos tecidos atacados, na época propícia e em níveis adequados para desencadear um efetivo controle da doença ou proteção vegetal. Atualmente, o promotor amplamente utilizado em programas de transformação genética de plantas é o CaMV35S, oriundo do Vírus do Mosaico da Couve-flor. Entretanto, existem relatos de declínio nos níveis de expressão do transgene conforme a idade da planta, bem como nos diferentes tecidos da planta (BAKSH et al., 2009; SUNILKUMAR et al., 2002; YOO et al., 2005). Os níveis de expressão direcionados por esse promotor também têm sido criticado devido a relatos de silenciamento do transgene em sítio de alimentação de nematoides (BERTIOLI et al., 1999; GHEYSEN e FENOLL, 2002). Devido a esses fatos, observa-se uma crescente busca por promotores de origem vegetal que sejam responsivos a estímulos bióticos (como infecção de nematoides na raiz ou ataque de insetos nas folhas), visando obter uma maior produção de transcritos de interesse em tecidos específicos de plantas GM para o controle de pragas.

### 1.3 – Utilização de promotores na transformação genética de plantas

Na medida que o conhecimento biológico avança, aumenta a quantidade, complexidade e interconexão dos mecanismos de regulação da expressão gênica. Entretanto, a etapa mais conhecida deste processo e, portanto, com maior aplicação ainda é a iniciação da transcrição.

O promotor é a região do DNA que recruta os fatores de transcrição (TFs) e a RNA polimerase (RNA pol) que irá executar a transcrição gênica. Ele é responsável pela primeira etapa da expressão gênica, que é formação do complexo de iniciação da transcrição. Em eucariotos, o promotor corresponde a região regulatória proximal (em torno de 1000 pb) localizado à montante (“upstream” ou extremidade 5’) do sítio de início da transcrição (TSS – “transcription start site”) do gene. Estruturalmente, o promotor pode ser separado em promotor basal e promotor específico (BUTLER e KADONAGA, 2002).

O promotor basal (“core promoter”) contém elementos mínimos para a transcrição do gene (TATA Box, CAAT Box, iniciador – Inr, elemento reconhecedor de TFIIB e Elemento promotor a jusante – DPE – do inglês *downstream promoter element*) e está mais relacionado com a indicação da posição e sentido que o complexo de pré-iniciação (PIC) transcricional deverá iniciar a síntese de RNA (FICKETT e HATZIGEORGIOU, 1997). Normalmente, não induz expressão diferencial conforme variação espacial, temporal e fisiológica. Denomina-se expressão basal aquela que ocorre em todos os tecidos, estádios e tratamentos, com intensidade transcricional baixa e uniforme. O promotor específico contém os elementos que determinam a intensidade que ocorre a transcrição, conforme o tecido, estádio, condição fisiológica, fatores bióticos e abióticos, direcionados por fatores de transcrição específicos (FICKETT e HATZIGEORGIOU, 1997; HOCHHEIMER e TJIAN, 2003). Esses elementos localizados em regiões mais distantes da região “core” são ativados por vários estímulos tanto endógenos (auxinas, giberelinas, ácido salicílico, ácido jasmônico) quanto exógenos (luz, temperatura, umidade, ataque de patógenos). A ação combinada das duas regiões (promotor basal e específico) determina a ativação ou repressão da expressão gênica ao nível de transcrição.

Os promotores são ferramentas-chave na transformação genética de plantas e têm sido extensivamente investigados com a finalidade de garantir níveis efetivos de expressão do transgene nos tecidos de interesse, bem como na época específica, podendo ser regulado pelo estímulo causador de dano. Entre os promotores atualmente utilizados para esse fim destacam-se o promotor 35S (ODELL et al., 1985), os promotores dos genes que codificam a nopalina sintase (NOS) e octopina sintase (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* (KONCZ et

al., 1983), o promotor do gene que codifica a poliubiquitina (Ubi-1) de milho (CHRISTENSEN et al., 1992) e o promotor do gene que codifica a actina (Act-1) de arroz (MCELROY et al., 1990). Apesar dos grandes avanços obtidos com o emprego desses promotores na transformação genética de plantas, os padrões de expressão dos transgenes são variados e baixos em alguns casos (GHEYSEN e FENOLL, 2002), não havendo garantia de expressão no tecido desejado.

A busca por promotores de genes vegetais geralmente inicia-se na identificação e caracterização de genes expressos em um determinado tecido, ou sob condições de estresse fisiológico, por meio de estudos de expressão gênica. A partir dessa caracterização funcional da expressão gênica, pode-se partir para estudos estruturais da região à montante do gene. Uma vez isolada a região promotora, essa pode ser verificada quanto à capacidade de direcionar a expressão de gene repórter em plantas geneticamente modificadas. Estratégias baseadas em deleções da região promotora têm sido muito eficientes em identificar regiões ativadoras (“acentuadores”) ou repressoras (“silenciadores”) da expressão gênica (CAI et al., 2007). Após a caracterização estrutural do promotor, construções gênicas para a transformação genética de plantas podem ser feitas, contendo somente as regiões de interesse (duplicadas ou retiradas) à montante do transgene.

Visando a geração de ferramenta biotecnológica para direcionamento de expressão de genes contra pragas da soja, a sequência promotora do gene codificador da enzima de conjugação a ubiquitina (E2) foi isolada do DNA de soja em nosso laboratório. Esse promotor foi nomeado como UceS8.3 e foi patentado (GROSSI DE SA et al., 2010). Para caracterizar a capacidade de direcionar a expressão gênica em diferentes tecidos, o promotor UceS8.3 foi clonado à montante do gene repórter *uidA* e seu potencial foi analisado através de ensaios histoquímicos e fluorimétricos da atividade enzimática da  $\beta$ -glucuronidase em plantas transformadas de *A. thaliana*. Foi observado que o UceS8.3 é um promotor constitutivo capaz de direcionar uma maior expressão de GUS, em diferentes tecidos (raiz, caule, folha e botão floral), quando comparado ao promotor comercial CaMV35S otimizado (regiões regulatórias duplicadas e junto com o *enhancer* de AMV (GROSSI DE SA et al., 2010). Um padrão diferenciado foi verificado em raízes, sendo a expressão de GUS mais forte na região meristemática, como relatado por (BIRD, 1996).

Os dados preliminares já obtidos por nossa equipe são promissores, sendo preponderante a caracterização do padrão de expressão do gene *E2*, dirigido pelo promotor UceS8.3, no organismo de origem (plantas de soja), considerando diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento, assim como a identificação de alterações no perfil de expressão gênica

em raízes de soja infectadas com *M. incognita* e em folhas de soja infestadas com *A. gemmatilis*.

#### 1.4 – Introdução à proteólise

As proteínas são componentes-chave para o funcionamento dos processos celulares. Sua síntese, assim como sua destruição, são processos de extrema importância para o funcionamento do organismo. Um distúrbio na formação de proteínas pode resultar em sérios danos para a célula, até o colapso de importantes processos metabólicos. Devido a esses fatores, as proteínas são frequentemente degradadas a aminoácidos e novas proteínas são ressintetizadas.

A proteólise intracelular funciona a partir de vários mecanismos, dependendo do tipo celular e da situação fisiológica. Em condição de privação nutricional ou hormonal a autofagia lisossomal é acelerada (HERSHKO, 1988). A degradação de proteínas pelo lisossomo não é muito seletiva, embora alguns trabalhos tenham sugerido que certas proteínas sejam direcionadas para o lisossomo por meio de sequências de aminoácidos específicas (HERSHKO, 1988). Ao contrário, vias de degradação de proteínas dependentes de energia são altamente seletivas.

Nas células eucarióticas, a maioria das proteínas é degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma (GOLDBERG, 2003). Na última década, muitos trabalhos demonstraram interesse nessa via devido a sua importância na célula. A célula degrada rapidamente proteínas mal dobradas formadas por mutação e também proteínas anormais resultantes de desnaturação espontânea, erros de transcrição (erro no processamento do RNA), tradução, doenças, estresses ou danos oxidativos (BUCHANAN et al., 2000; GOLDBERG, 2003). Quando não são removidas, essas proteínas podem formar grandes agregados insolúveis e muitas vezes tóxicos para a célula (BUCHANAN et al., 2000). Essas proteínas aberrantes com erro no dobramento expõem sinais de degradação que normalmente ficariam escondidos no seu interior, esses sinais são rapidamente reconhecidos pela maquinaria proteolítica e a proteína é destruída (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008).

Além da função proteolítica, a ubiquitinação tem sido associada a vários processos celulares como endocitose, transdução de sinal, controle da transcrição gênica, reparo do DNA e replicação do DNA (HAGLUND e DIKIC, 2005).

#### 1.4.1 – Modificação de proteínas pela adição de ubiquitina

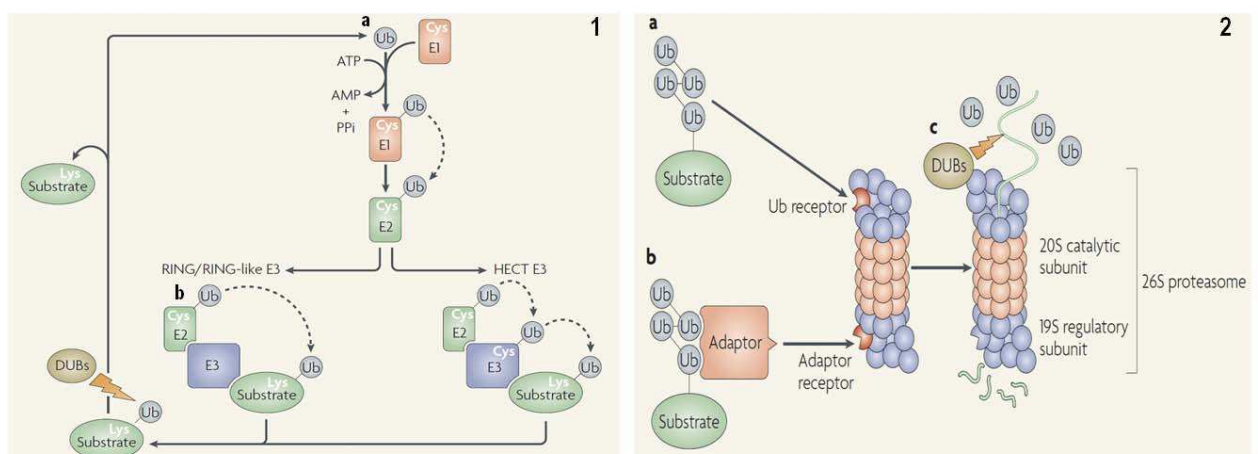
A ubiquitinação ocorre quando o C-terminal da ubiquitina (proteína altamente conservada, com apenas 76 aminoácidos) é ligado a um grupo amino de um resíduo de lisina da proteína-alvo. Quando somente uma única molécula de ubiquitina é ligada a uma proteína-alvo o processo é denominado monoubiquitinação (JADHAV e WOOTEN, 2009). Esse processo também ocorre quando vários resíduos de lisina da proteína-alvo são atacados por moléculas de ubiquitina individualmente, nesse caso o processo é conhecido como múltipla monoubiquitinação (HAGLUND e DIKIC, 2005; JADHAV e WOOTEN, 2009). A monoubiquitinação está envolvida em processos de endocitose, reparo do DNA e controle da expressão gênica por regulação de histonas (MURATANI e TANSEY, 2003). A poliubiquitinação ocorre quando uma cadeia de ubiquitinas é fixada em um ou mais resíduos de lisina da proteína-alvo (BUCHANAN et al., 2000). Essa cadeia é formada através de resíduos de lisina internos da ubiquitina. A ubiquitina contém sete resíduos de lisina (6, 11, 27, 29, 33, 48 e 63) que podem formar diferentes tipos de cadeia (HAGLUND e DIKIC, 2005). As cadeias de ubiquitinas mais caracterizadas até o momento são aquelas ligadas através da Lys 48 e Lys 63, mas somente as cadeias ligadas através da Lys 48 servem como sinal para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (HAGLUND e DIKIC, 2005). As cadeias de poliubiquitinas ligadas através da Lys 63 desempenham um papel fundamental na regulação de processos tais como reparo de DNA (HOFMANN e PICKART, 1999; SPENCE et al., 1995), transdução de sinal (MUKHOPADHYAY e RIEZMAN, 2007; SUN e CHEN, 2004); e tráfico intracelular de proteínas de membrana (GEETHA et al., 2005; HICKE, 1999; MUKHOPADHYAY e RIEZMAN, 2007).

#### 1.4.2 – Degradação de proteínas mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma

A ubiquitinação consiste numa modificação pós-traducional reversível, em que uma molécula de ubiquitina é ligada a uma proteína-alvo por meio de uma cascata enzimática de três passos: primeiro o grupo carboxílico da glicina existente no C-terminal da ubiquitina é ativado com consumo de ATP por uma enzima de ativação a ubiquitina (E1), a qual se torna presa por uma ligação tioéster (LI e YE, 2008). Em seguida, a ubiquitina ativada é transferida para uma cisteína do sítio ativo de uma segunda enzima, a enzima de conjugação a ubiquitina (E2) (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008); com a ajuda de uma terceira enzima, a ligase de ubiquitina ou E3, a enzima E2 catalisa a transferência da ubiquitina até a proteína destinada à

destruição (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008) (Figura 2 – 1a). Cadeias de poliubiquitinas são formadas entre a lisina de uma ubiquitina e o grupo carboxílico terminal de outra ubiquitina. Em certas circunstâncias, fatores adicionais, como o fator de alongamento de ubiquitina (E4), podem ser recrutados para, junto com ubiquitinas ligases, continuar o alongamento da cadeia de ubiquitina (LI e YE, 2008).

A especificidade de ligação da ubiquitina à proteína alvo se dá por meio da enzima E3. Existem duas classes distintas de E3. A primeira classe é caracterizada por um domínio RING (ou RING-finger). O domínio RING possui a capacidade de quelar dois íons de zinco, através dos seus oito locais de coordenação, constituídos por histidinas e cisteínas, e medeiam interações com as proteínas-alvo (RAMOS, 2002). As E3 com domínio RING vinculam as E2 e o substrato e catalisa a transferência da ubiquitina diretamente de E2 para o substrato sem o envolvimento de uma ligação tioéster entre E3-Ub (LI e YE, 2008). A segunda classe de E3 é definida pela existência de um domínio HECT (*homologous to the E6-AP protein's C-terminus*), que possui a atividade catalítica direta na ubiquitinação do substrato. A proteína E6-AP foi a primeira ligase de ubiquitina identificada com domínio HECT participando da degradação da proteína supressora de tumor p53 que interage com a proteína E6 do papilomavírus humano, por isso esse nome (RAMOS, 2002). A ubiquitina ativada de E2 é transferida para um resíduo de cisteína conservado no domínio HECT de E3 antes de finalmente ser transferido para o substrato (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008) (Figura 2 – 1b).



**Figura 2. A maquinaria do sistema ubiquitina-proteossoma.** Retirada de (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008)

Cadeias de poliubiquitina com pelo menos quatro ubiquitinas servem como sinal de degradação pelo proteassoma 26S (Figura 2 – 2a). O proteassoma é um complexo proteico constituído por um complexo catalítico 20S central e por dois complexos regulatórios 19S posicionados em ambas as extremidades (RAMOS, 2002). A proteína-alvo para destruição pode se ligar diretamente a receptores de ubiquitina presentes no complexo regulatório do proteassoma 26S ou a proteínas adaptadoras que contêm domínios de ligação a ubiquitina e ao proteassoma (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008) (Figura 2 – 2b). Após a ligação da proteína-alvo ao proteassoma essa é desdobrada por ATPases que circundam o poro do núcleo catalisador e em seguida ocorre a remoção da cadeia de poliubiquitinas por enzimas desubiquitinases (DUBs) (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008). Por último ocorre a translocação da proteína desdobrada pela câmara proteolítica central, onde ela é clivada em peptídeos curtos por proteases (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008) (Figura 2 – 2c).

Algumas proteínas com erro no dobramento expõem sinais de degradação (“degrons”) que normalmente ficariam escondidos no seu interior (RAVID e HOCHSTRASSER, 2008). Em 1986, Bachmair e colaboradores descobriram que a meia-vida de uma proteína depende do aminoácido presente no seu N-terminal (*N-end rule pathway*) (BACHMAIR et al., 1986; GRACIET e WELLMER, 2010). Este postulado afirma que certos aminoácidos, designados por desestabilizadores (como Lys, Arg, His, Phe, Tyr, Trp, Ile, Leu, Asp, Glu e Asn), presentes no N-terminal de algumas proteínas, servem como sinal para uma rápida degradação proteolítica. Proteínas com resíduos desestabilizadores, como a arginina ou leucina, são reconhecidos pela E3 $\alpha$  ou N-recognina (uma E3 do tipo RING *finger*) que, juntamente com uma E2 específica medeiam a poliubiquitinação da proteína que é então rapidamente degradada pelo proteassoma (RAMOS, 2002). Outros resíduos desestabilizadores são encontrados em proteínas ricas em prolina (P), glutamato (E), serina (S) e treonina (T), designados por PEST (ROGERS et al., 1986), quando expostos a superfície de uma proteína, são também reconhecidos como sinais de destruição pelo proteassoma (RAMOS, 2002). Proteínas recém sintetizadas necessitam da ação de chaperonas moleculares para obter seu dobramento correto e muitas vezes isso não ocorre, levando à degradação dessa proteína. Cerca de 30% das proteínas recém-sintetizadas em eucariotos podem sofrer degradação após poucos minutos da sua síntese (GOLDBERG, 2003).



### 1.4.3 – Enzimas da via ubiquitina-proteassoma

As enzimas da via ubiquitina têm sido caracterizadas em vários organismos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*, mas poucos trabalhos têm sido conduzidos em plantas. Cerca de 6% do genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica proteínas envolvidas com o sistema ubiquitina-proteassoma (DREHER e CALLIS, 2007). Apenas dois genes (AtUBA1 e AtUBA2) codificadores de enzimas de ativação a ubiquitina E1 têm sido relatados em *A. thaliana* (HATFIELD et al., 1997). Em contraste com o baixo número de genes codificadores para enzimas E1, os genes codificadores para enzimas E2 e E3 representam grandes famílias multigênicas. Em leveduras (*S. cerevisiae*), 13 genes codificadores para enzimas E2 foram encontrados; 50 genes foram encontrados no genoma humano e 37 genes no genoma de *A. thaliana* (ZHOU et al., 2010). Todas estas enzimas possuem um domínio muito conservado (UBC – ubiquitin conjugating), com cerca de 150 aminoácidos contendo um tripeptídeo HPN (histidina, prolina e asparagina) e um resíduo de cisteína no seu sítio ativo capaz de aceitar a ubiquitina ativada pela enzima E1 (MICHELLE et al., 2009; RAMOS, 2002). Ao contrário das enzimas E2, as ligases de ubiquitinas E3 são pouco conservadas, em parte devido a sua função no reconhecimento dos diversos sinais para a destruição da proteína-alvo.

### 1.4.4 – Via ubiquitina proteassoma e estresse biótico em plantas

O papel da ubiquitinação no desenvolvimento de plantas tem sido extensivamente revisado por vários autores, sendo o foco maior na caracterização de ligases de ubiquitina E3 nos processos fisiológicos da planta (HELLMANN e ESTELLE, 2002; MOON et al., 2004). Nas plantas, há relatos de transcritos de genes pertencentes à via ubiquitina acumulados durante a senescência foliar e durante o ataque de patógenos (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; DEVOTO et al., 2003). Este processo está relacionado em parte com a morte celular programada (MCP) ativada em resposta aos estágios finais de senescência foliar e em resposta ao ataque de patógenos (por meio de reações de hipersensibilidade), em que a planta sacrifica certos tecidos como uma estratégia de sobrevivência (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 2003; MOREL e DANGL, 1997; WOO et al., 2001).

Trabalhos anteriores mostraram que o gene codificador de E2 da família LeUBC4 é abundantemente expresso em células gigantes de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas com *M. incognita* (BIRD, 1996; GHEYSEN e FENOLL, 2002), indicando um

possível papel dessa proteína em respostas a estresse biótico. Além disso, E2 envolvidas na resposta a estresses têm sido bem caracterizadas em leveduras (*S. cerevisiae*), em que E2 de classe I ScUBC4 e ScUBC5 desempenham um papel na degradação seletiva de proteínas anormais e de meia-vida curta (SEUFERT e JENTSCH, 1990). Essas enzimas são induzidas por choque térmico, e experimentos têm demonstrado que essas proteínas são essenciais para o crescimento e a viabilidade celular em temperaturas elevadas e na presença de proteínas anormais (SEUFERT e JENTSCH, 1990). Homólogos aos genes codificadores das enzimas UBC4/5 têm sido identificados em outras plantas, incluindo os genes AtUBC8, 9, 10, 11 e 12 de *A. thaliana* (GIROD et al., 1993), o gene PsUBC4 de ervilha (*Pisum sativum*) (WOO et al., 1994) e o gene OsUBC de arroz (*Oryza sativa*) (CHEN et al., 1995).

Os genes *EL5* e *OsUBC5b*, codificadores de enzimas E3 e E2, respectivamente, mostraram ser induzidos após o tratamento de células de arroz com N-acetylchitoheptaose, indicando um forte papel desses genes em respostas de defesa das plantas através da renovação de proteínas (TAKAI et al., 2002). O nível de transcrição de dois genes UBC também foi relatado ser ativado em *Nicotiana attenuata* durante o ataque do inseto *Manduca sexta* (HUI et al., 2003). Todos esses trabalhos sugerem um forte envolvimento da via ubiquitina-proteassoma com estresse biótico em plantas.

### 1.5 – Análise da expressão gênica utilizando PCR em tempo real

Atualmente, várias técnicas estão disponíveis para analisar mudanças na expressão gênica em nível transcricional em amostras biológicas, como *Northern blots*, *Microarray*, RT-PCRs convencionais e Hibridização *in situ*. Entretanto, o método que apresenta maior sensibilidade e especificidade para quantificar pequenas variações na quantidade de mRNAs é a técnica de quantitativo Real-Time PCR (qRT-PCR). Esta técnica baseia-se no processo transcrição reversa (RT) seguida por reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR), sendo o produto quantificado por meio de moléculas fluorescentes incorporadas ao DNA, as quais podem ser monitoradas durante a cinética de reação (em “tempo real”). Vários fluoróforos têm sido utilizados para esse fim, como sondas hidrolíticas (TaqMan), sondas de hibridização (Molecular Beacons), sondas-primer (Amplifluor<sup>TM</sup> e Scorpions), FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e corantes intercalantes (SYBR® Green) (KUBISTA et al., 2006). Entretanto, este último tem sido o mais utilizado devido ao baixo custo, à facilidade de uso e à sensibilidade.

O método utilizado para quantificar mudanças na expressão gênica entre amostras biológicas é a quantificação relativa, em que uma amostra controle (calibrador) é comparada com a amostra do tratamento e a razão de expressão entre elas é calculada. No modelo matemático de (PFAFFL, 2001), considera-se a eficiência de amplificação de cada gene, calculado pela fórmula  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  e inseridos na fórmula:

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct alvo (controle - amostra)}}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta\text{Ct ref. (controle - amostra)}}$$

Para essas análises, faz-se necessária a normalização dos genes estudados, uma vez que pode haver diferenças na quantidade e na qualidade do RNA inicial. Realiza-se essa normalização com a utilização de genes de referência internos, também chamados de genes constitutivos (ou “*housekeeping genes*”) (GUENIN et al., 2009). A escolha de genes de referência apropriados é fundamental para se obter resultados precisos, uma vez que, apesar desses genes apresentarem uma expressão uniforme na maioria dos tecidos, eles podem variar em diferentes fases do desenvolvimento, diferentes condições ambientais e diferentes tratamentos biológicos (EXPOSITO-RODRIGUEZ et al., 2008).

Vários programas têm sido utilizados para a identificação e a classificação dos melhores genes constitutivos. Entre eles, destacam-se o programa geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e o NormFinder (ANDERSEN et al., 2004). O programa geNorm determina quais são os genes normalizadores mais estáveis em um conjunto de amostras e determina quantos genes de referência são necessários para uma normalização segura. Este programa calcula o valor de estabilidade do gene (M), baseado na média geométrica dos genes testados e na média da variação par a par de um gene contra os outros nas diferentes amostras (VANDESOMPELE et al., 2002). A estabilidade dos genes de referência é determinada partindo do princípio que dois genes normalizadores ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras, independentemente de condições ambientais ou experimentais. Um baixo valor M indica uma expressão mais estável. O geNorm avalia a razão de expressão de cada gene de referência em relação aos demais genes, sempre aos pares, o que permite a exclusão dos genes menos aceitáveis. A cada gene excluído, o programa atribui automaticamente um novo valor referente à estabilidade dos demais genes nas amostras. Esse processo ocorre diversas vezes até que permaneçam apenas os genes cujos níveis de expressão sejam os mais estáveis, determinando, assim, a combinação adequada de normalizadores a serem utilizados nas análises de PCR em Tempo Real. O autor recomenda a utilização mínima de três genes de referência para uma normalização confiável

(VANDESOMPELE et al., 2002). Para determinar a necessidade de utilizar mais do que três genes normalizadores na análise dos dados de PCR em Tempo Real, é recomendável fazer a inclusão sequencial de outros genes normalizadores e avaliar o impacto dessa inclusão no fator de normalização. Se a inclusão do novo normalizador não variar o fator de normalização, a inclusão dele não é necessária. Um valor de 0,15 foi estabelecido como um valor de corte, acima do qual a inclusão de um novo normalizador seria necessária para a obtenção dos fatores de normalização (VANDESOMPELE et al., 2002). Outro programa utilizado para a escolha dos melhores genes de referência é o programa NormFinder. Esse programa é baseado num modelo matemático que permite estimar não somente a variação dos genes nas diferentes amostras, mas também a variação entre subgrupos da amostra. Ele também calcula o valor de estabilidade para todos os genes de referência candidatos e indica o melhor gene (ou a combinação dos dois melhores genes para compor o fator de normalização) com a menor variação intragrupos e intergrupos (ANDERSEN et al., 2004).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de expressão gênica da enzima de conjugação a ubiquitina (E2) de plantas de soja em diferentes tecidos, fases do desenvolvimento, em raízes infestadas com *Meloidogyne incognita* e folhas atacadas por *Anticarsia gemmatalis*, pela técnica de qRT-PCR, a fim de determinar o padrão de expressão gênica direcionada pelo promotor UceS8.3.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificar os melhores genes de referência para normalizar a expressão do gene *E2* nos diferentes tecidos, fases do desenvolvimento e nos tratamentos experimentais de submissão a estresse biótico;
2. Cultivar plantas de soja em casa de vegetação e coletar diferentes tecidos em momentos distintos e nos tratamentos estipulados;
3. Mensurar a expressão gênica de *E2* em diferentes tecidos e fases do desenvolvimento de soja por meio de qRT-PCR;
4. Mensurar a expressão gênica de *E2* em raízes de soja inoculada com o nematoide de galha *Meloidogyne incognita* por meio de qRT-PCR;
5. Mensurar a expressão gênica de *E2* em folhas de soja infestadas com lagartas da soja (*Anticarsia gemmatalis*) por meio de qRT-PCR;
6. Identificar prováveis *cis*-elementos no promotor UceS8.3 possivelmente associados à regulação da expressão do gene *E2* nos diferentes tecidos de soja e nos tratamentos de estresses utilizando ferramentas de bioinformática.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 – Cultivar de soja

A cultivar de soja BRSGO Raissa foi utilizada nos experimentos de análise espacial e temporal da expressão do gene *E2* e no experimento de soja submetida ao ataque de larvas de *A. gemmatalis*. Nos experimentos de soja infectada com o nematoide *M. incognita*, utilizou-se a cultivar Santa Rosa devido a sua maior susceptibilidade ao ataque deste patógeno (Tabela 1).

**Tabela 1.** Cultivares de soja (*Glycine max*) utilizadas nos experimentos de qRT-PCR

Cultivar	Características principais	Reação a doenças	Origem
BRSGO Raissa	Ciclo médio, floração após 40 dias de semeadura, primeira vagem após 62 dias, maturação completa com 123 dias, crescimento determinado	Moderadamente susceptível a <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> , Resistente a <i>H. glycines</i> raça 3	Embrapa Cerrados
Santa Rosa	Ciclo médio, floração após 62 dias de semeadura, primeira vagem após 67 dias.	Susceptível a <i>M. incognita</i> raça 1 e a <i>H. glycines</i> raça 3	Embrapa Soja

##### 3.1.2 – Obtenção dos patógenos para utilização nos bioensaios com soja

Nematoide de galha (*Meloidogyne incognita* raça 1) – O inóculo cedido pela Embrapa Soja foi utilizado para infectar plantas hospedeiras de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Kada Gigante. A multiplicação dos nematoides é realizada em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, alternando a inoculação do solo contaminado entre plantas de tomate e soja.

Lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) – A criação dos insetos é feita de forma artificial em laboratório (Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Os adultos da lagarta-da-soja (mariposas) são colocados em condições adequadas de temperatura, umidade e fotoperíodo, no interior de gaiolas plásticas para acasalamento e oviposição. As mariposas colocam os ovos sobre um papel branco que reveste as paredes internas da gaiola. O papel com ovos é retirado e substituído diariamente, sendo os

ovos lavados, descolados e transferidos para a face interior das tampas de papel cartolina dos copos de papelão parafinado (sorvete), que contém dieta artificial para as lagartas. Deste modo, as lagartas recém-eclodidas passam a se alimentar da dieta, permanecendo nesse meio até a fase de pré-pupa. A seguir, estas são transferidas para caixas plásticas (tipo gerbox), contendo vermiculita, até a formação das pupas, que são separadas por sexo e colocadas nas gaiolas para acasalamento e oviposição, na proporção de um macho para uma fêmea (SHMIDT et al., 2001).

### 3.1.3 – Amostras utilizadas para análise da expressão gênica

O experimento de expressão foi realizado com amostras complexas (*pool*), constituídas de mesmo tecido, sob mesmo tratamento, de três indivíduos diferentes. Todo experimento de expressão foi realizado uma segunda vez, separadamente, para obtenção de duplicata biológica para os 24 tecidos/tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Conjunto de tecidos/ tratamentos utilizados para a análise da expressão gênica

Nº	Cultivar	Tecido	Estádio do desenvolvimento	Ponto de tempo	Tratamento
1	Raíssa	Raiz	V4	-	-
2	Raíssa	Caule	V4	-	-
3	Raíssa	Folha	V4	-	-
4	Raíssa	Raiz	R2	-	-
5	Raíssa	Caule	R2	-	-
6	Raíssa	Folha	R2	-	-
7	Raíssa	Flor	R2	-	-
8	Raíssa	Raiz	R4	-	-
9	Raíssa	Caule	R4	-	-
10	Raíssa	Folha	R4	-	-
11	Raíssa	Vagem	R4	-	-
12	Santa Rosa	Raiz	V2	7 d.a. i	Controle não inoculado
13	Santa Rosa	Raiz	V4	14 d.a. i	Controle não inoculado
14	Santa Rosa	Raiz	V5	21 d.a. i	Controle não inoculado
15	Santa Rosa	Raiz	V6	28 d.a. i	Controle não inoculado
16	Santa Rosa	Raiz	V2	7 d.a. i	Inoculado com <i>M. incognita</i>
17	Santa Rosa	Raiz	V4	14 d.a. i	Inoculado com <i>M. incognita</i>
18	Santa Rosa	Raiz	V5	21 d.a. i	Inoculado com <i>M. incognita</i>
19	Santa Rosa	Raiz	V6	28 d.a. i	Inoculado com <i>M. incognita</i>
20	Raíssa	Folha	V4	0 h	Controle sem larva
21	Raíssa	Folha	V4	15 min	Infestado com larva de <i>A. gemmatalis</i>
22	Raíssa	Folha	V4	30 min	Infestado com larva de <i>A. gemmatalis</i>
23	Raíssa	Folha	V4	1 h	Infestado com larva de <i>A. gemmatalis</i>
24	Raíssa	Folha	V4	3 h	Infestado com larva de <i>A. gemmatalis</i>

### 3.1.4 – Kits e reagentes utilizados

DNaseI Amplification Grade (Invitrogen)

SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen)

*Sybr Green Rox Plus* Master Mix 2X (LGC)

Reagente Trizol (Invitrogen)

### 3.1.5 – Oligonucleotídeos

A eficiência de amplificação dos genes foi determinada utilizando o programa *Real-Time PCR Miner* para cada experimento individualmente (Anexo 1), e uma eficiência geral dos genes, considerando todos os experimentos juntos, também foi calculada (Tabela3).

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real

Símbolo	Forward primer Sequence (5'-3')	Reverse primer Sequence (5'-3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Localização do iniciador	Eficiência (%)
<i>CYP2</i>	CGGGACCAGTGTGCTTCTTCA	CCCCTCCACTACAAAGGCTCG	154	S*	98,3
<i>ELF1A</i>	GACCTTCTTCGTTTCTCGCA	CGAACCTCTCAATCACACGC	195	D	102,4
<i>TUA5</i>	AGGTCGGAAACTCCTGCTGG	AAGGTGTTGAAGGCGTCGTG	159	S	101,7
<i>ELF1B</i>	GTTGAAAAGCCAGGGGACA	TCTTACCCTTGAGCGTGG	118	D	92,5
<i>ACT11</i>	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	GTCTTTCGTTCAATAACCCTA	142	D	104,1
<i>UBC2</i>	TCCCCTCACACCCTTCCTC	CCATCCCAAGGGGTGTCAT	155	D	107,6
<i>TUB</i>	CCTCGTTCGAATTCGCTTTTTG	CAACTGTCTTGTCGCTTGGCAT	161	S	96,4
<i>G6PD</i>	ACTCCTTGATACCGTTGTCAT	GTTTGTATCCGCTACAGCCT	126	D	110,7
<i>E2</i>	GAGCGAGCAGTTTCAGAC	CATAGGAGGGACGATACG	168	D	98,0
<i>RB7</i>	TTGTAGGTGTCTCCGTCGC	AATGCTCTGGCGGTGATG	179	S	87,3

\* Desenho de iniciadores (*primers*): D – diferentes éxons; S – no mesmo éxon

### 3.1.6 – Ferramentas de Bioinformática

- Mastercycler ep realplex versão 1.5 – Programa para análises de PCR em tempo real vinculado ao termociclador da Eppendorf.

- *Real-Time PCR Miner* – programa para a determinação da eficiência de amplificação dos genes estudados.

- qBASE Plus (Biogazelle) versão 2008-2009 – Programa para análise de expressão relativa utilizando múltiplos genes referência. Licença demo disponível em: <http://www.biogazelle.com/site/products/qbaseplus>

- geNorm – Aplicativo para o Excel que visa determinar os genes referência mais estáveis.

- NormFinder – Aplicativo para o Excel que visa determinar os genes referência mais estáveis.



- REST versão 2.0.13 – Programa de análise de expressão relativa contendo ferramentas de análise estatística.

- SigmaPlot versão 10 – programa para edição de gráficos

- Primer 3 – Programa para desenho e análise de *primers*.

- Oligo Tech 1.00 – Programa para desenho e análise de *primers*.

- Genevestigator – é uma ferramenta da Web (aplicativo *JavaScript* instalado no computador) para a investigação da expressão gênica baseado nos resultados de milhares de experimentos de microarranjo.

- GENOSOJA – Consórcio Nacional para Estudos do Genoma da Soja (LGE Soybean Genome database), financiado pelo CNPq e envolvendo centros de pesquisa como Embrapa Soja, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade de Campinas (Unicamp), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Universidade Estadual Paulista (Unesp) e a Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec). Disponível em <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/soja/>.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 – Coleta de tecidos de soja em diferentes estádios do desenvolvimento

Sementes de soja (*Glycine max* cv. BRSGO Raíssa) foram semeadas em sacos plásticos de 20 litros, com a adição de uma mistura contendo fungicida e inoculante de *Rhizobium* para fixação biológica de nitrogênio, e colocadas para germinar em casa de vegetação. A primeira coleta foi realizada com plantas no estádio de V4, onde diferentes tecidos (folha, caule e raiz) de três indivíduos foram coletados e congelados imediatamente em N<sub>2</sub> líquido. A segunda coleta ocorreu com plantas no estádio de R2 e os mesmos tecidos foram coletados acrescentando a coleta de flores. A última coleta ocorreu com plantas no estádio de R4, em que se acrescentou a coleta vagens com cerca de 2 cm presentes em qualquer nó superior da haste principal. Para os experimentos de análise da expressão do gene *E2* por qRT-PCR, todas as etapas foram repetidas num segundo momento, a fim de constituir duplicata biológica.

### 3.2.2 – Bioensaio de soja infectada com o nematoide *M. incognita*

Os fitonematoides endoparasitas obrigatórios foram cultivados em plantas hospedeiras de tomate (*Solanum lycopersicum*). Dessa forma, *M. incognita* raça 1 foi inoculado em plantas susceptíveis de tomate cultivar Kada Gigante, em casa de vegetação, para a multiplicação dos nematoides. As plantas de tomate com cerca de 40 centímetros foram inoculadas com solo contendo raízes infectadas. Cerca de 30-40 dias após inoculação (d.a.i), as raízes apresentando galhas foram coletadas e a extração dos nematoides em diferentes fases de vida foi realizada.

As raízes infestadas com galhas foram retiradas dos sacos e lavadas com água corrente para a retirada de solo. Em seguida, as raízes foram trituradas no liquidificador com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) e separadas em peneiras de 100 e 400 mesh. O material coletado na peneira de 400 mesh foi misturado com caulim (substrato inerte de gesso) e centrifugado a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em sacarose 50% (p/v). Após uma segunda centrifugação a 2500 x g por 1 minuto, os ovos foram coletados do sobrenadante em peneira de 400 mesh. A suspensão de ovos livres de impurezas foi colocada em câmaras de eclosão, que foram mantidas sob temperatura de 28°C. Após 24 horas, os juvenis de segundo estágio (J2) foram recolhidos e contados em câmaras de Peters.

Para a execução do experimento, sementes de soja (*Glycine max* cv. Santa Rosa) foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e colocadas para germinar em sacos contendo areia estéril umedecida e mantidas em sala crescimento com temperatura de 25-28°C, umidade 70% dia/ 80% noite e fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro. Após 7-10 dias, as plântulas com cerca de 10 centímetros foram inoculadas com uma suspensão contendo cerca de 5000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* previamente extraído, por planta. Os juvenis foram introduzidos em quatro pontos ao redor do caule e as plantas foram regadas com água estéril (destilada) duas vezes por semana. Semanalmente, adicionou-se adubo líquido NPK 10-10-10 com micronutrientes juntamente com água. Aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação (d.a.i), as raízes foram coletadas na região da galha (células gigantes) e em uma região equivalente à região da galha na planta não inoculada (controle). Uma amostra de cada tratamento foi separada no momento da coleta para coloração com fucsina ácida (BYBD et al., 1983). Durante a coleta, fez-se um *pool* de três plantas para cada tecido/tratamento e este foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Os mesmos tecidos foram coletados para o controle não infectado. Para os

experimentos de análise da expressão do gene *E2* em sítios de alimentação de nematóide, realizou-se mais uma replicata biológica de todos os tecidos analisados nas mesmas condições.

### 3.2.3 – Coloração de nematoides em raiz de soja utilizando fucsina ácida

As raízes foram coletadas e lavadas em água corrente para a remoção da areia aderida. Em seguida, as raízes foram cortadas em segmentos de 1-2 centímetros e transferidas para um béquer de 150 mL contendo 50 mL de NaClO (hipoclorito de sódio 2%), onde permaneceram por 6 minutos, com agitação ocasional. Depois do tratamento com NaClO, os segmentos de raízes foram lavados em água corrente (30 a 45 segundos) para a retirada dos resíduos de hipoclorito. Em seguida, as raízes foram novamente colocadas em um béquer contendo água por mais 15 minutos. Após esse período, as raízes foram transferidas para outro recipiente contendo 30 mL de água e 1 mL de corante (fucsina ácida). Esta solução foi colocada em ebulição por 30 segundos. Após voltar à temperatura ambiente, o excesso de corante foi retirado por lavagem em água. Posteriormente, as raízes foram colocadas em um béquer contendo 20-30 mL de glicerina acidificada. Após esse procedimento, as raízes foram colocadas em lâminas e observadas em microscópios para a confirmação da infecção das plantas pelos juvenis (J2) de *M. incognita* (BYBD et al., 1983).

### 3.2.4 – Bioensaio de soja submetida à desfolha por *Anticarsia gemmatalis*

Sementes de soja (BRSGO Raíssa) foram germinadas em sacos plásticos de 20 litros, contendo uma mistura de areia e solo (2:1). A produção do material biológico foi executada em sala de crescimento com temperatura de 25-28°C, umidade 70% e fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro. O estresse foi submetido com plantas de soja no estágio V4, em que frequentemente ocorre o ataque de insetos e lagartas desfolhadoras. Para o estresse, 25 lagartas de quarto instar criadas em dieta artificial foram separadas em placas de petri e distribuídas em dois trifólios para iniciarem a alimentação. As folhas de três plantas estressadas foram coletadas nos tratamentos 0, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a adição das lagartas (WALLEY et al., 2007). As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA. Todas as etapas anteriores foram repetidas num segundo momento, para constituir duplicata biológica.

### 3.2.5 – Análise *in silico* do padrão de expressão dos genes referência em *Arabidopsis thaliana*

A acurácia dos resultados obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real está intimamente relacionada com uma precisa análise de estabilidade dos genes de referência utilizados na normalização do gene-alvo. Por esse motivo, genes constitutivos clássicos relatados na literatura foram identificados e analisados quanto a sua estabilidade na plataforma Genevestigator. Os genes escolhidos foram uma Ciclofilina 2 – CYP2, Fator 1-alfa de alongamento da tradução – ELF1A, Fator 1-beta de alongamento da tradução – ELF1B, actina 11 – ACT11,  $\beta$ -tubulina (TUB),  $\alpha$ -tubulina 5 (TUA5), uma glicose 6-fosfato desidrogenase – G6PD e uma Enzima de conjugação a ubiquitina (família UBC2) (JIAN et al., 2008). A sequência dos genes de *A. thaliana* foi submetida a um BLASTn no Banco de dados Phytozome visando encontrar os ortólogos desses genes no genoma da soja (Tabela 4). Em seguida, iniciadores (*primers*) foram desenhados em diferentes éxons para a utilização nos experimentos de PCR em tempo real. Após a realização dos experimentos de PCR em tempo real, os valores de *Ct* de cada gene referência foram convertidos em quantidade relativa não-normalizada empregando o programa qBASE versão 1.3.5, utilizando a eficiência real de cada gene, e em seguida os genes foram analisados quanto a sua estabilidade pelos programas geNorm e NormFinder.

**Tabela 4.** Genes utilizados para a análise de expressão gênica em soja

Símbolo do Gene	Locus do gene	Número de acesso no NCBI	Locus em <i>Arabidopsis</i>	Nome do gene	Função
<i>CYP2</i>	Glyma12g02790.1	CF806591	AT2G21130	<i>Ciclofilina 2</i>	Envolvida no dobramento de proteínas
<i>ELF1A</i>	Glyma05g24110.1	BT093688.1	AT5G60390	<i>Fator 1-alfa de alongamento da tradução</i>	Alongamento da tradução
<i>TUA5</i>	Glyma05g29000.1	CA801144	AT5G19780	<i><math>\alpha</math>-tubulina 5</i>	Constituinte estrutural do citoesqueleto
<i>ELF1B</i>	Glyma14g04350	AK286947.1	AT5G19510	<i>Fator 1-beta de alongamento da tradução</i>	Alongamento da tradução
<i>ACT11</i>	Glyma18g52780.1	BW652479	AT3G12110	<i>Actina 11</i>	Proteína estrutural do citoesqueleto
<i>UBC2</i>	Glyma18g16160	AK244261.1	AT2G02760	<i>Enzima de conjugação a ubiquitina (família UBC2)</i>	Enzima envolvida nos processos de reparo de DNA e Endocitose
<i>TUB</i>	Glyma04g09350.1	AC235288	AT1G50010	<i><math>\beta</math>-tubulina</i>	Constituinte estrutural do citoesqueleto
<i>G6PD</i>	Glyma19g24250	AK244997.1	AT5G40760	<i>Glicose 6-fosfato desidrogenase</i>	Enzima da via de metabolismo da glicose
<i>E2 (UBC4)</i>	Glyma18g44850	AF532622.1	AT5G41700	<i>Enzima de conjugação a ubiquitina (promotor UceS8.3)</i>	Enzima envolvida na degradação de proteínas anormais e de vida curta
<i>RB7</i>	Glyma11g03690.1	AI494844.1	AT4G17340	<i>Aquaporina</i>	Proteína de canal de água (aquaporina)

### 3.2.6 – Análise do padrão expressão do gene E2 em soja

Visando relacionar genes da família de enzimas de conjugação a ubiquitina com estresses bióticos e abióticos em soja, realizou-se uma busca nas bibliotecas subtrativas, feitas

por Solexa, presentes no banco Genosoya (LGE Soybean Genome database). A busca foi realizada utilizando o código referente à identificação dos genes no genoma (Glyma) obtido através do banco Phytozome. As bibliotecas subtrativas pesquisadas no banco são: raízes e folhas da cultivar Embrapa-48 (tolerante) submetidas ao estresse de seca e coletadas após 25 a 150 minutos; folhas dos acessos PI230970 (resistência não-hospedeira) e PI561356 (resistência vertical) infectadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da Ferrugem asiática da soja (coletadas após 1 a 192 horas após a infecção); e raízes da cultivar MG/BR46 (Conquista) inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpe CPAC 15 (para fixação biológica de nitrogênio) versus raiz com/sem adubo nitrogenado.

Para analisar a expressão do gene *E2*, foram desenhados oligonucleotídeos (*primers*) para sua região 5'UTR com o objetivo de quantificar a produção e acúmulo de mRNA específico do gene controlado pelo promotor UceS8.3. Os oligonucleotídeos senso e antisense foram desenhados em diferentes éxons, otimizados pelo programa Oligo Tech 1.00 e se localizam a -165 e -18 à montante do códon de iniciação da tradução, respectivamente.

Também foram desenhados oligonucleotídeos para o gene que codifica uma proteína de canal de água de soja (RB7). Essa proteína é conservada entre várias plantas e foi caracterizada por estar presente em raiz de plantas de tabaco e por ser super-expressa em células gigantes induzidas por *M. incognita* (CONKLING et al., 1990; OPPERMAN et al., 1994). O ortólogo desse gene em soja foi encontrado em banco de dados para desenho de oligonucleotídeo baseados em região conservada. Esse gene foi selecionado para ser utilizado como um controle positivo nos estudos de identificação de transcritos de *E2* em células gigantes.

### 3.2.7 – Análise filogenética de proteínas UBC

Uma análise filogenética foi conduzida utilizando-se as sequências proteicas dos 37 genes codificadores de enzima de conjugação a ubiquitina em *Arabidopsis thaliana*, os 13 genes pertencentes à família E2 de soja em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e os dois genes codificadores de E2 de soja utilizados nesse estudo. O alinhamento múltiplo foi conduzido utilizando-se as sequências completas de proteínas de todos os organismos. A análise filogenética, conduzida no programa MEGA v5.0, foi inferida utilizando o método Neighbor-Joining (NJ) (KUMAR et al., 2008). A árvore consenso inferida a partir de um *bootstrap* de 1000 repetições, foi tomada para representar a história evolutiva das espécies analisadas. Ramos correspondentes a partições reproduzido em menos de 50% *bootstrap*

repetições foram recolhidos. As distâncias evolutivas foram calculados usando o método de correção de Poisson e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 52 sequências de aminoácidos.

### 3.2.8 – Análise de prováveis cis-elementos no promotor UceS8.3

O promotor UceS.8.3, previamente isolado e patenteado (GROSSI DE SA et al., 2010) corresponde a um fragmento de DNA de 1171 pb. Essa sequência promotora foi submetida aos bancos PLACE e PlantCARE para a investigação de elementos *cis*-regulatórios envolvidos na regulação da expressão gênica obtida (HIGO et al., 1999; ROMBAUTS et al., 1999).

### 3.2.9 – Extração de RNA total (Método Trizol)

Os tecidos foram coletados em *pool*, rotulados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O RNA total foi então extraído a partir de 100 mg de cada *pool*. Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e colocados em tubos de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de Trizol em cada tubo e agitou-se por 30 segundos. Os tubos permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram centrifugados, por 10 minutos, a 4°C e a 12.000 x g. O sobrenadante foi coletado com auxílio de uma micropipeta e transferido para um novo tubo, onde permaneceu incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de clorofórmio para promover a precipitação. Os tubos foram incubados por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugados, por 15 minutos, a 4°C e a 12.000 x g. A fase aquosa foi removida com auxílio de uma micropipeta e transferida para novo tubo (1,5 mL), onde foram adicionados 300 µL de isopropanol (álcool isopropílico) e 300 µL de tampão citrato (0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M de NaCl). Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugados, por 15 minutos, a 4°C e a 12.000 x g. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 75%, mantendo-se uma agitação por 30 segundos, para lavar bem o precipitado e posterior centrifugação, por 5 minutos, a 4°C e a 8000 x g. O sobrenadante foi novamente descartado com inversão imediata do tudo sob papel filtro. O precipitado (*pellet*) foi seco em fluxo por, aproximadamente, 20 minutos e ressuscitado em 30 µL água Milli-Q tratada com DEPC. Para análise da integridade do RNA total, utilizou-se eletroforese em gel

de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio e a quantificação foi realizada pela leitura da OD<sub>260</sub> utilizando o espectrofotômetro NanDrop ND-1000.

### 3.2.10 – Reação de transcrição reversa

O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado a partir do 1 µg de RNA total de cada tecido extraído. A transcrição reversa consiste na síntese de um cDNA a partir de um molde de RNA, por uma DNA-polimerase-RNA dependente, chamada de transcriptase reversa. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen). Inicialmente, 4 µg de RNA total foi tratado com a DNase I (Kit DNaseI Amplification Grade – Invitrogen) conforme instruções do fabricante para eliminação de possíveis contaminações com DNA genômico. Em seguida, 8 µL desse mesmo RNA, 2 µL do Mix RT Enzyme (SuperScript™ III e RNaseOUT™) e 10 µL do Mix 2X RT Reaction Mix (oligo(dT)<sub>20</sub>, random hexamers, MgCl<sub>2</sub> e dNTPs) foram incubados a 50°C por 30 minutos para a reação de transcrição reversa (RT). A transcriptase reversa foi inativada a 85°C por 5 minutos. Por fim, foi adicionado 2 U de RNase H e a reação foi incubada a 37°C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

### 3.2.11 – Validação dos cDNAs obtidos por RT-PCR convencional

O RT-PCR é uma reação em cadeia da polimerase que utiliza como molde um cDNA (ele é fita simples, antisenso, reverso e complementar ao mRNA). Uma primeira reação foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos para os genes de referência (*housekeeping*) e para o gene *E2*, para verificar se todos os oligonucleotídeos estavam amplificando um único *amplicon*. Para todos os experimentos, realizou-se uma reação de RT-PCR, antes do qRT-PCR, para verificar se todos os cDNAs estavam funcionais. As reações foram conduzidas com cDNA diluído 20X, tampão de reação 1X, 200 nM de cada oligonucleotídeo, 250 µM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U de Taq DNA polimerase Recombinante (Invitrogen). O programa da PCR utilizado foi um passo inicial de 95°C por três minutos, seguindo por 35 ciclos de 95°C por dez segundos, 55°C por dez segundos e 72°C por quinze segundos, finalizando com uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

### 3.2.12 – Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Após padronizar a amplificação por RT-PCR, obtendo-se um fragmento único do tamanho esperado, o cDNA foi diluído 20 vezes e utilizado como molde no qRT-PCR. Os experimentos de PCR em tempo real foram conduzidos no termociclador Mastercycler realplex (Eppendorf). A PCR continha os seguintes reagentes: *Sybr Green Rox Plus* Master Mix 2X (LGC), 200 nM de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso) e 2 µL do cDNA (1:20), referente a cada condição experimental analisada. Todos os experimentos foram analisados em triplicata experimental. O programa de PCR utilizado foi: 95°C por quinze minutos para a ativação da enzima Taq DNA polimerase (hot start), 95°C por vinte segundos, 55°C por vinte segundos e 72°C por vinte segundos repetidos por quarenta ciclos. A curva de desnaturação (“*melting curve*”) foi realizada após o término da amplificação para verificar a presença de produtos inespecíficos ou dímeros formados entre os oligonucleotídeos. O programa foi 95°C por quinze segundos, 60°C por quinze segundos, subindo dois graus por minuto até chegar a 95°C.

Os dados brutos de fluorescência de todas as corridas foram importados para o programa *Real-time PCR Miner*, a fim de determinar o ciclo *threshold* (*Ct*) e a eficiência de PCR (ZHAO e FERNALD, 2005). O programa *Miner* baseia-se na cinética individual das reações de PCR e determina a eficiência de reação, sem a necessidade de uma curva padrão. Ele utiliza os pontos iniciais e finais da fase exponencial da PCR para estimar a eficiência da reação para cada amostra/gene e, em seguida, calcula a média e o coeficiente de variação da eficiência para cada gene.

A análise de expressão gênica foi realizada utilizando o programa qBASEPlus que utiliza múltiplos genes de referência para a normalização e considera a eficiência real da PCR para cada gene (HELLEMANS et al., 2007). Os valores de *Ct* das duas replicatas biológicas juntas e o valor de eficiência de cada gene gerados pelo *Miner* foram importados para o programa qBASEPlus para determinar a expressão relativa dos genes *E2*, *RB7* e *CYP2*. Com base na análise de estabilidade gerado pelo geNorm, os melhores genes para cada condição experimental foram indicados no qBASE para a normalização do gene-alvo.

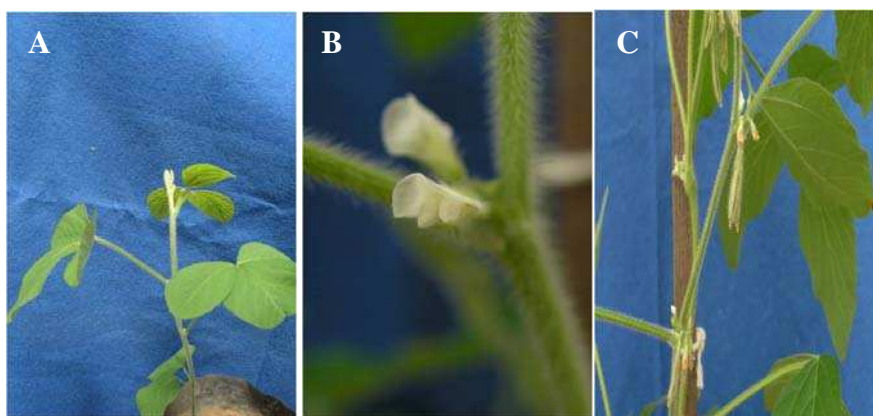
O programa REST foi utilizado para análise estatística dos experimentos. Este programa calcula as variações no *Ct* e na expressão relativa por meio de testes de randomização para obter o nível de significância, fornecendo o P-value e os intervalos de confiança (PFAFFL et al., 2002).



## 4. RESULTADOS

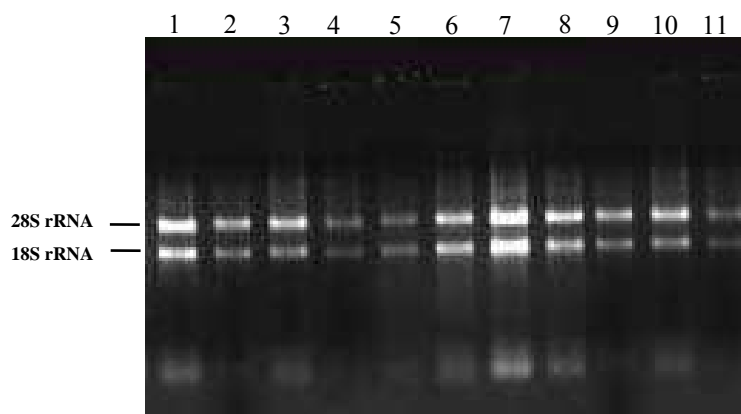
### 4.1 – Obtenção de amostras de soja para a determinação do perfil de expressão espacial e temporal do gene *E2*

Para se proceder à análise de expressão espacial e temporal do gene *E2*, sementes de soja foram semeadas em solo e acondicionadas em casa de vegetação. A germinação ocorreu cinco dias após a semeadura, e as folhas trifolcadas completamente desenvolvidas apareceram em intervalos de cinco dias (Figura 3). As amostras de folhas e caules de cada planta foram coletadas na região mais apical. As amostras de flores coletadas continham todos os verticilos florais. Já as amostras radiculares foram obtidas por coleta preferencial das pontas das raízes.



**Figura 3. Estádios fenológicos da soja.** (A) planta no estágio de V4 com a terceira folha trifolcada completamente desenvolvida; (B) planta no estágio de R2 com florescimento completo; (C) planta no estágio R4 com vagens completamente desenvolvidas, caracterizado pela presença de vagens com 2 cm de comprimento em um dos quatro nós superiores da haste principal.

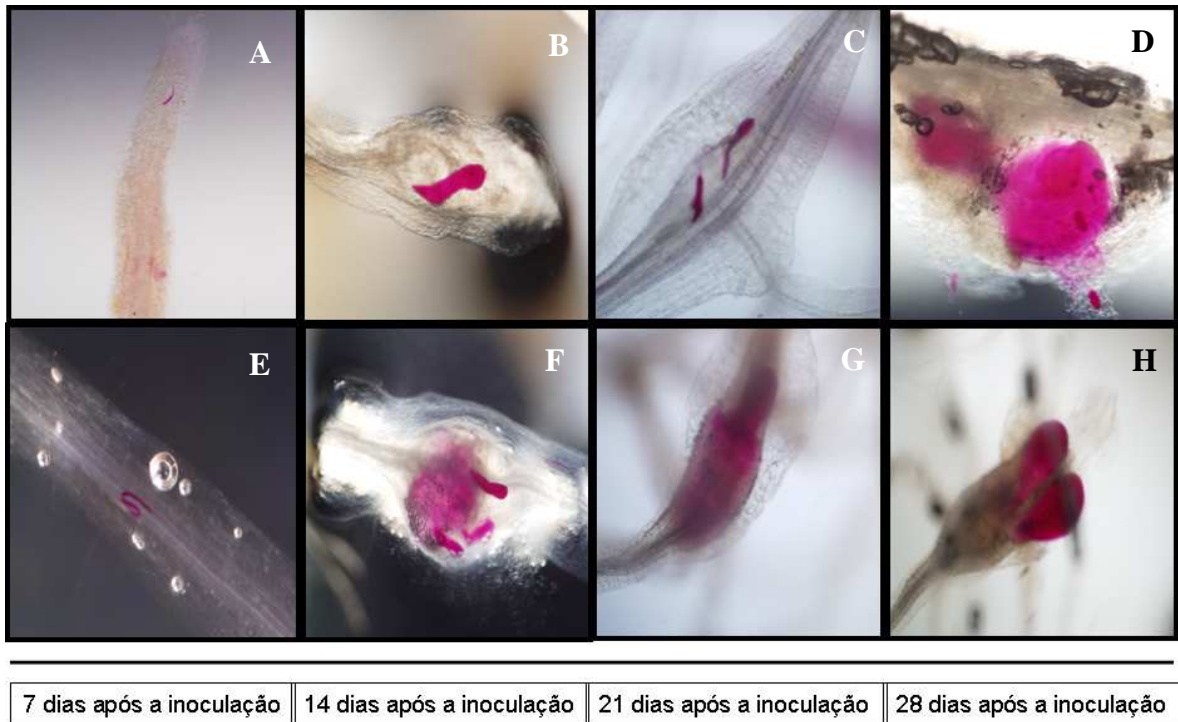
Foram obtidos, em média, 5  $\mu$ g de RNA de cada amostra, que foram tratados com DNase I e observados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, a fim de verificar a integridade das amostras de RNA trabalhadas (Figura 4).



**Figura 4. RNA total extraído de diferentes tecidos de plantas de soja em diferentes estádios de desenvolvimento.** Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) raiz de V4, (2) caule de V4, (3) folha de V4, (4) raiz de R2, (5) caule de R2, (6) folha R2, (7) flor de R2, (8) raiz de R4, (9) caule de R4, (10) folha R4, (11) vagem de R4.

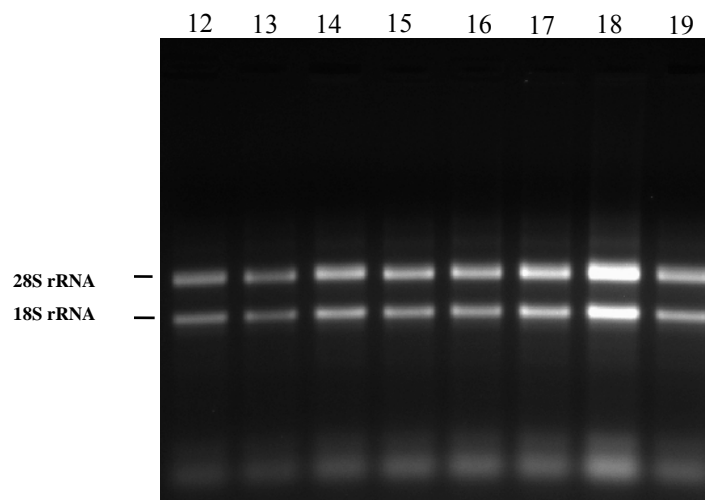
#### 4.2 – Bioensaio de soja infectada pelo nematoide *M. incognita*

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (Fitotron). Os nematoides foram multiplicados em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) para a obtenção do inóculo. As plantas de soja, cultivadas até atingirem o estágio de V1, foram inoculadas com uma suspensão contendo cerca de 5000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* por planta. O processo de infecção foi monitorado por coloração com fucsina ácida. As raízes clarificadas e coradas com fucsina ácida mostraram que aos 7 d.a.i vários J2 haviam penetrado nas pontas das raízes e migrado para o cilindro central (início do estabelecimento do sítio de alimentação) (Figura 5 A e E). A penetração foi verificada até os 14 d.a.i. Aos 14 dias, foi possível observar juvenis (J2/J3) no formato de salsicha dentro do cilindro vascular (Figura 5 B e F). Nesse período, já as raízes infectadas começaram a aumentar o seu diâmetro (formação de galhas). Aos 21 d.a.i, as galhas estavam maiores e mais largas. Os juvenis (J3/J4) continuavam aumentando a sua largura, e foi possível observar a presença de algumas fêmeas com a forma globoide nas raízes infectadas (Figura 5G). Aos 28 dias, as raízes apresentavam grandes galhas, espalhadas tanto na região superior da raiz quanto nas regiões mais laterais. Foi possível observar fêmeas globosas, que romperam o córtex radicular e emergiram na superfície da raiz para depositar ovos na matriz gelatinosa no exterior da planta (Figura 5D).



**Figura 5. Progresso da infecção por nematoides (*M. incognita*) de galha em raízes de soja susceptível. (A e E) Juvenis de segundo estágio (J2) nos períodos iniciais de infecção após 7 d.a.i; (B e F) juvenis alimentados após estabelecerem o sítio de alimentação aos 14 d.a.i; (C e G) galhas bem desenvolvidas com 21 d.a.i e (D e H) fêmeas depositando ovos aos 28 d.a.i.**

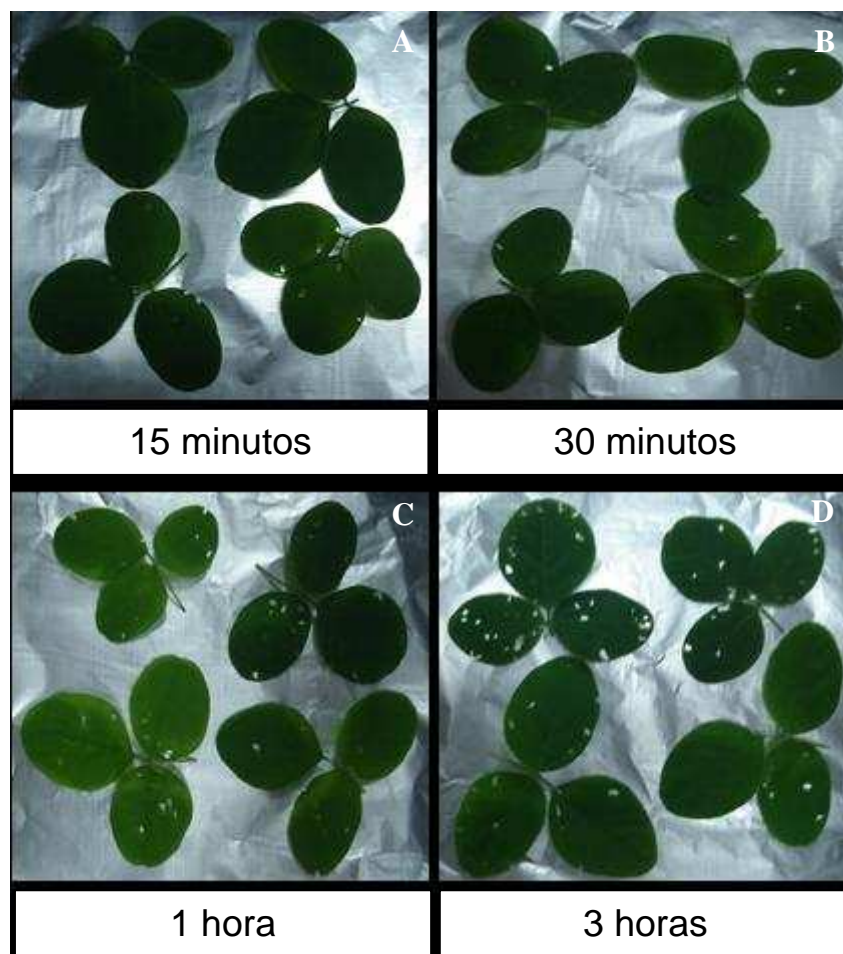
Partindo das amostras coletadas e congeladas, o RNA total foi extraído e sua integridade conferida por eletroforese, para posterior síntese de cDNA (Figura 6).



**Figura 6. RNA total extraído de raiz infectada por *M. incognita*. Eletroforese em gel de agarose 1%. (12) 7 d.a.i controle, (13) 7 d.a.i inoculado, (14) 14 d.a.i controle, (15) 14 d.a.i inoculado, (16) 21 d.a.i controle, (17) 21 d.a.i inoculado, (18) 28 d.a.i controle, (19) 28 d.a.i inoculado.**

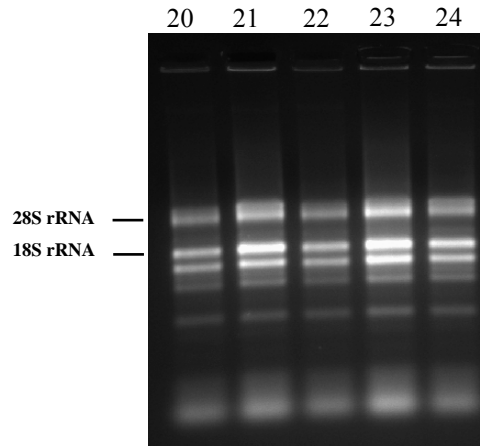
#### 4.3 – Bioensaio de soja submetida à desfolha por *A. gemmatalis*

As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento (Fitotron) até atingirem o estágio de V4 (período de grande ataque por lagartas da soja nas plantações de soja). Em seguida, 25 lagartas de quarto instar foram adicionadas em dois trifólios. Essa fase de quarto instar é chamada de mede-palmo devido ao movimento que as lagartas fazem para se locomover, como se estivessem medindo palmo. As lagartas consomem o limbo foliar e as nervuras, deixando pequenos buracos nas folhas, provocando redução da área foliar e da taxa fotossintética. Nesse estágio, as lagartas penduram-se por um fio de seda, tanto para mudar de lugar na planta quanto para não caírem no solo (também chamado “estádio de fio”). Nesse período, as lagartas estão mais vorazes, sendo possível observar furos no limbo foliar proporcionalmente ao tempo de exposição às lagartas (Figura 7).



**Figura 7: Bioensaio de soja com lagartas de quarto instar de *A. gemmatalis*.** (A) Folhas de soja após 15 minutos de exposição às lagartas de *A. gemmatalis*; (B) 30 minutos de exposição; (C) 1 hora de exposição e (D) 3 horas de exposição.

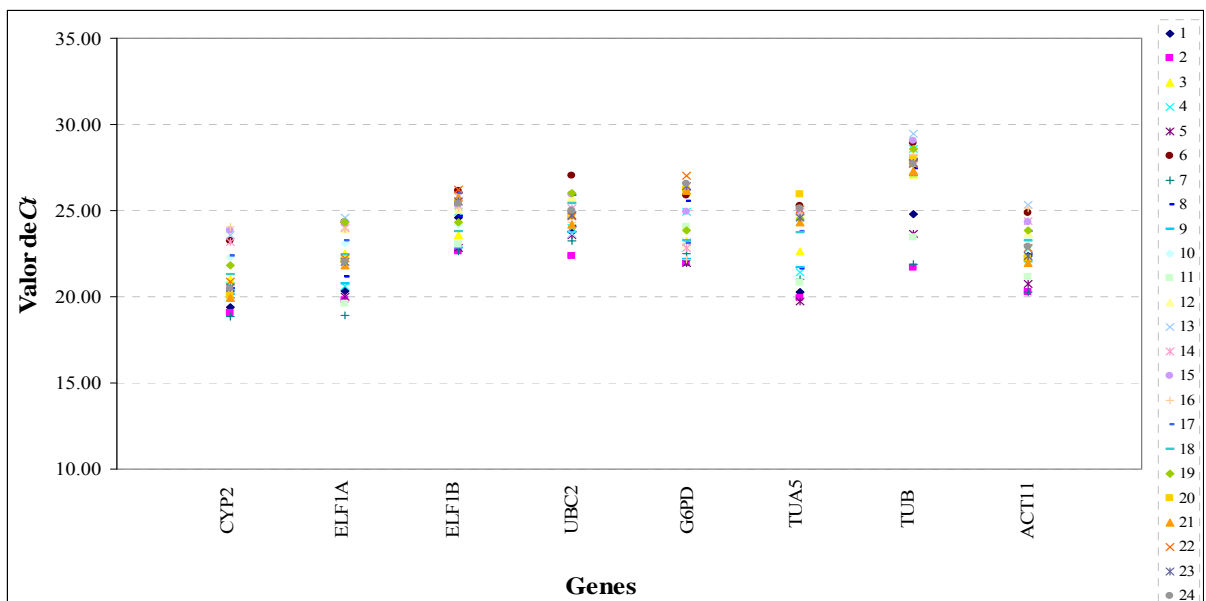
As amostras coletadas e congeladas foram submetidas à extração de RNA total e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 8).



**Figura 8.** RNA total extraído de folha submetida ao ataque de lagartas de *A. gemmatalis*. Eletroforese em gel de agarose 1%. (20) 0 h – controle; (21) 15 min; (22) 30 min; (23) 1 h e (24) 3 h.

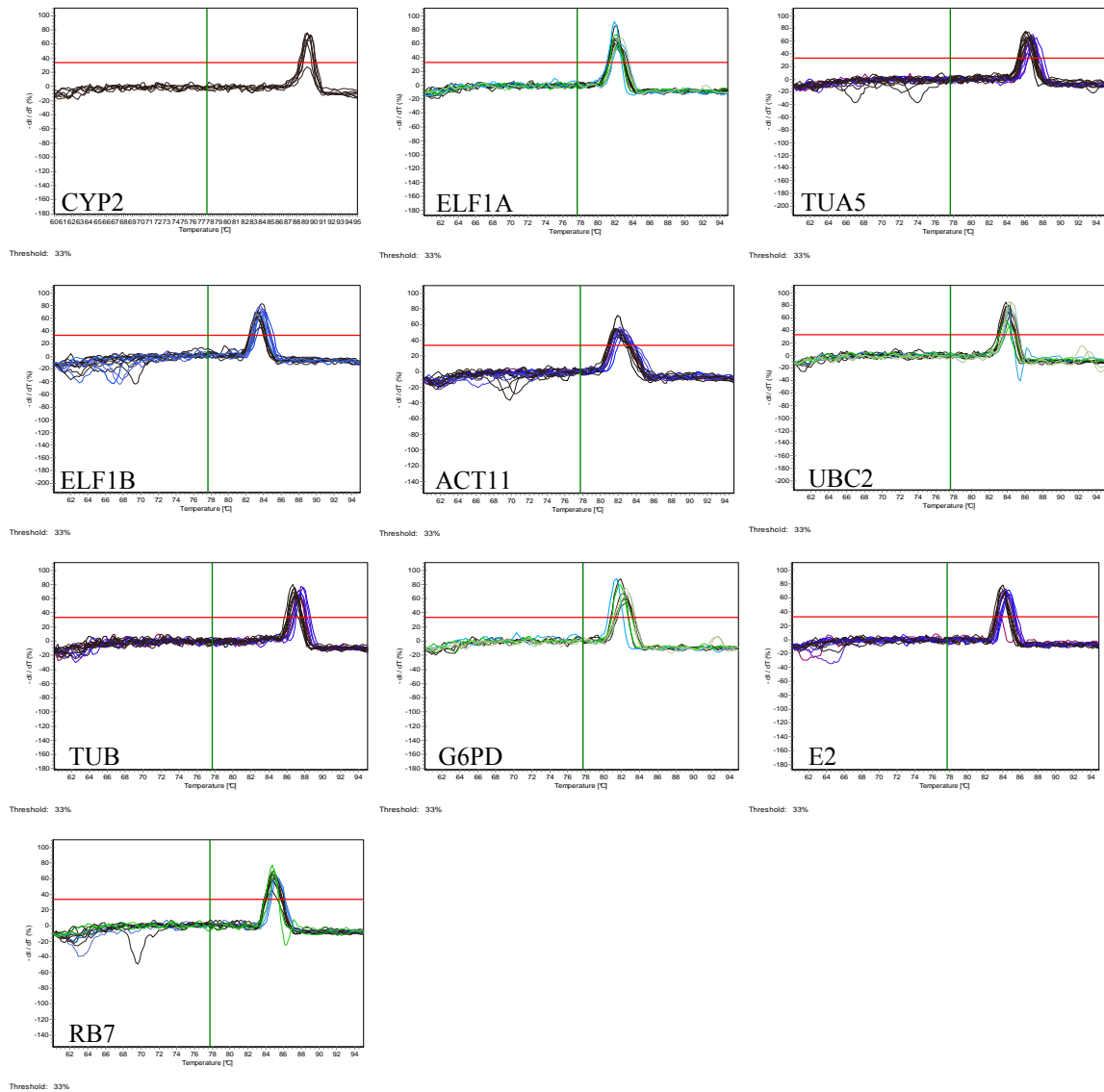
#### 4.4 – PCR quantitativo

As amplitudes de expressão dos oito genes verificado no Genevestigator são as mesmas que a expressão do gene *E2*, o que é altamente recomendado para tornar preciso os resultados de qPCR. Verificou-se que esse padrão se manteve nos resultados de PCR em tempo real (Figura 9). Entre os três experimentos realizados, o experimento que apresentou maior variação nos dados brutos foi diferentes tecidos em um mesmo estágio de desenvolvimento.



**Figura 9:** Níveis de expressão dos genes de referência com valores absolutos de *Ct* para todas as amostras analisadas. As amostras utilizadas nessa análise estão descritas na tabela 2.

A qualidade do cDNA e dos oligonucleotídeos foi confirmada por RT-PCR, e a especificidade de amplificação de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação adicionada aos passos finais da PCR em tempo real (Figura 10).



**Figura 10.** Curva de dissociação da amplificação dos genes estudados.

#### 4.4.1 – Genes de referência em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento da soja

Os valores de  $C_t$  referentes às três fases do desenvolvimento, obtidos pelo programa *Miner PCR*, foram convertidos em quantidade relativa não-normalizada pelo programa *qBASE v1.3.5*, utilizando-se a eficiência de cada gene e a amostra com menor expressão como calibradora. Essas quantidades (duas replicatas juntas) foram importadas pelo programa *geNorm* para classificar os melhores genes de referência. Em seguida, esses mesmos valores

(quantidade relativa não-normalizada) foram inseridos no programa NormFinder, visando obter um segundo parâmetro de análise para a escolha dos genes mais estáveis nos tratamentos estudados.

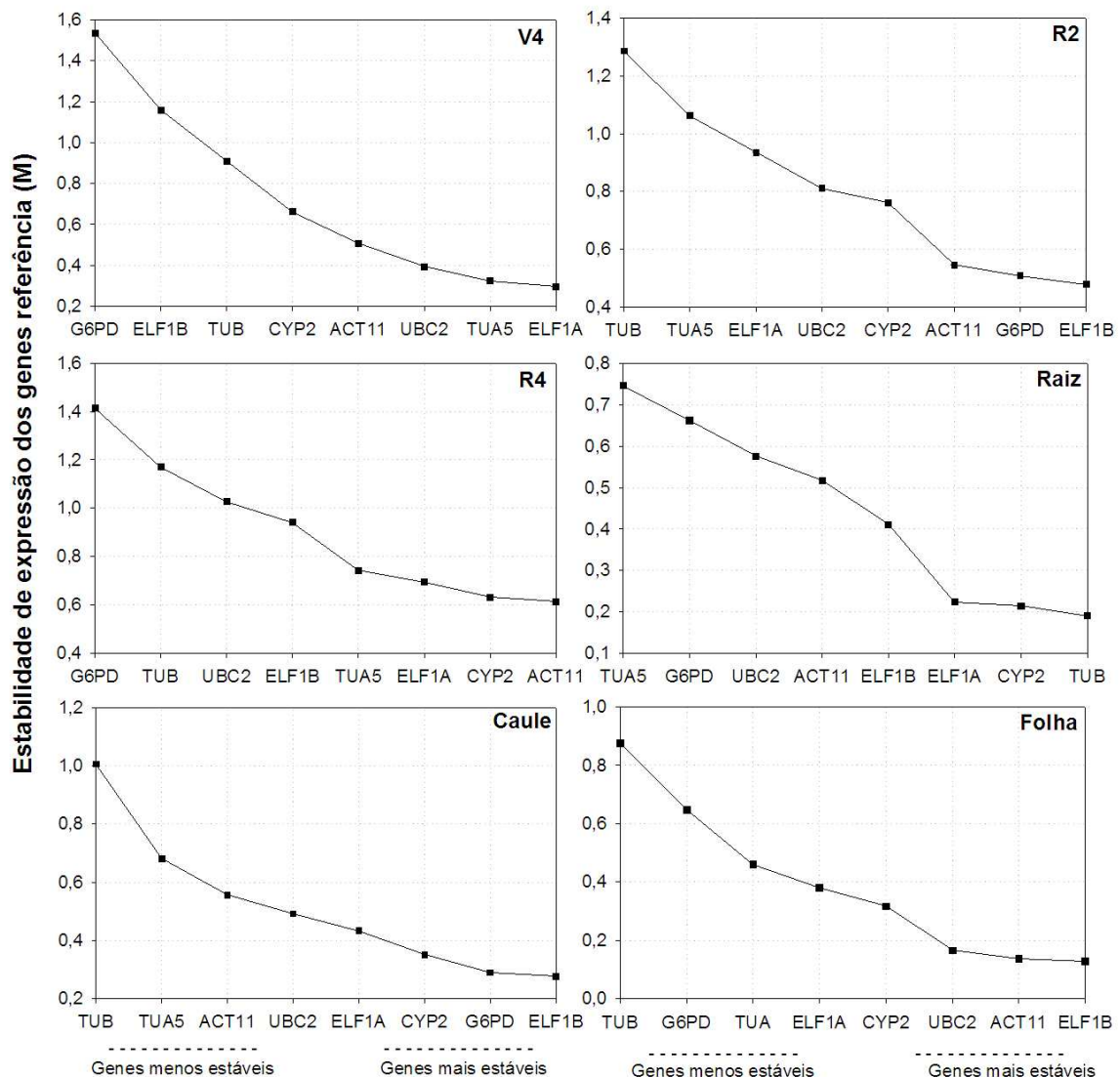
A análise foi conduzida inicialmente visando identificar os genes cuja expressão era mais estável entre os diferentes tecidos. De acordo com o geNorm, os genes mais estáveis entre os tecidos no estágio V4 foram os genes ELF1A, TUA5 e UBC2 (Figura 11 V4). Em todas as condições analisadas, os valores M foram menores que a linha de base 1,5 traçada (exceto em diferentes tecidos em V4) pelo programa, indicando que os genes apresentaram boa estabilidade. O valor M é baseado na média geométrica dos genes testados e na média de variação par a par de um gene contra todos os outros nas diferentes amostras. O programa classifica os genes de acordo o seu valor M, ou seja, genes com baixo valor M apresentam alta estabilidade de expressão. Os genes ELF1B e G6PD foram os mais estáveis entre os tecidos no estágio R2, e TUB foi o menos estável (Figura 11 R2). No estágio R4, os genes ACT11, CYP2 e ELF1A foram os mais estáveis (Figura 11 C).

Considerando a série de desenvolvimento da planta, a segunda análise visava identificar os genes mais estáveis entre os três estádios do desenvolvimento da planta. Na série de desenvolvimento, os genes mais estáveis em raiz foram TUB e CYP2 e para caule foram os genes ELF1B, G6PD e CYP2 (Figura 11 D e E). Em folha, os genes ELF1B e ACT11 apresentaram alta estabilidade, e o gene TUB foi o menos estável (Figura 11 F). O gene ELF1B apresentou uma boa estabilidade na série de desenvolvimento para os três tecidos (raiz, caule e folha), e o gene TUA5 foi o menos estável.

A estabilidade de expressão gênica (M) indica o quanto esse gene variou entre as amostras analisadas. O gene de referência ideal seria aquele que possui uma razão de expressão idêntica em todas as amostras, indicando que ele pode ser usado unicamente para normalizar a expressão do gene-alvo. Entretanto, esse perfil ideal de expressão de gene referência não é encontrado frequentemente. Atualmente, a abordagem mais utilizada para a normalização se baseia na utilização de vários genes referência para constituir o fator de normalização (FN). O número ideal de genes referência para uma normalização precisa foi calculado pelo programa geNorm. A variação par a par ( $V_n/V_{n+1}$ ) entre dois fatores de normalização ( $FN_n/FN_{n+1}$ ) são usados para determinar a necessidade de adicionar um próximo gene referência para a normalização.

De acordo com o geNorm, três genes são necessários para normalizar o gene alvo entre diferentes tecidos no estágio V4, devido ao valor V estar abaixo do valor de corte (0,15) sugerido por Vandesompele e colaboradores (2002), excluindo a necessidade de adicionar

mais um gene para compor o fator de normalização (Figura 12). Entre os diferentes tecidos no estágio R2, quatro genes são necessários para compor o fator de normalização. No estágio R4, o valor V de todas as combinações de genes referência ficou acima do valor de corte. Entretanto, o valor mais próximo de 0,15 foi V3/4, indicando que os três genes mais estáveis são necessários para a normalização. Na série de desenvolvimento para os tecidos de raiz e folha, apenas os dois genes mais estáveis são necessários para a normalização; e para caule, os genes ELF1B, G6PD e CYP2 devem ser usados na normalização.



**Figura 11. Valor de estabilidade de expressão dos genes estudados gerado pelo programa geNorm. (V4) Diferentes tecidos no estágio V4, (R2) diferentes tecidos no estágio R2, (R4) diferentes tecidos no estágio R4. Série de desenvolvimento: (R) raiz, (C) caule e (F) folha.**



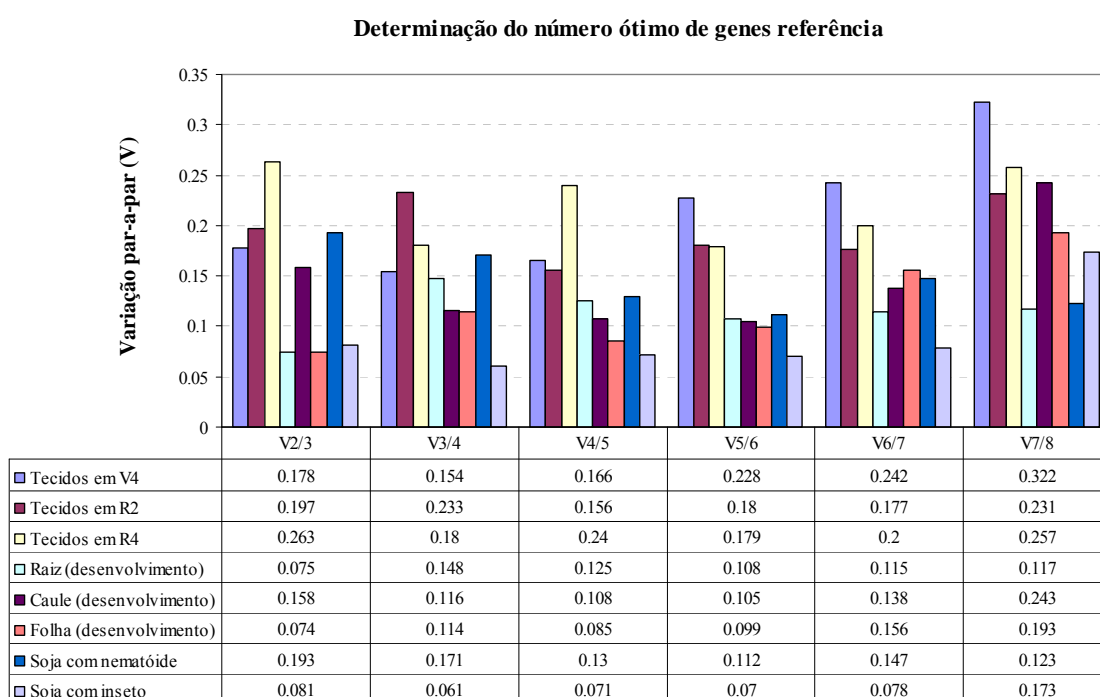
A estabilidade de expressão foi reanalisada utilizando o programa NormFinder. Esse programa classifica os genes de acordo com sua estabilidade de expressão num conjunto de condições experimentais. O NormFinder seleciona os melhores genes com o melhor fator de normalização, baseado na menor variação intragrupos e intergrupos (diferentes tecidos e diferentes replicatas biológicas, respectivamente), enquanto o geNorm seleciona os melhores genes com a menor variação intragrupos e com a mesma variação intergrupos (ANDERSEN et al., 2004).

A classificação gerada por esse programa foi um pouco diferente do que a determinado pelo programa geNorm. O gene mais estável entre os tecidos em V4 foi TUB, com um valor de estabilidade de 0,419, e a melhor combinação de dois genes para compor o fator de normalização foram os genes ACT11 e TUB, com um valor de estabilidade de 0,305 (Tabela 5). No estágio R2, os genes mais estáveis foram ACT11, TUA5 e G6PD, confirmando o resultado obtido pelo programa geNorm (G6PD e ACT11 ocuparam a 2º e 3º posição, respectivamente). Já no estágio R4, o gene mais estável foi ACT11 e os melhores genes para o fator de normalização foram ACT11 e ELF1A. Nesse estágio, os dois programas apontaram uma classificação similar para todos os genes analisados. Na série de desenvolvimento, o gene ELF1A teve uma boa estabilidade nos três tecidos analisados, sendo que o gene mais estável em caule foi o gene UBC2, com um valor de estabilidade de 0,150, e para raiz e folha foi o gene ELF1A.

**Tabela 5.** Estabilidade de expressão dos genes referência calculado pelo programa NormFinder

Classificação	Tecidos em V4		Tecidos em R2		Tecidos em R4		Raiz (desenvolvimento)	
	Gene	Estabilidade	Gene	Estabilidade	Gene	Estabilidade	Gene	Estabilidade
1	TUB	0.419	ACT11	0.457	ACT11	0.168	ELF1A	0.340
2	ELF1A	0.427	TUA5	0.579	ELF1A	0.256	G6PD	0.711
3	ACT11	0.441	G6PD	0.801	TUA5	0.277	CYP2	0.761
4	UBC2	0.457	ELF1A	0.911	CYP2	0.301	TUA5	0.816
5	TUA5	0.566	UBC2	0.979	ELF1B	0.360	UBC2	1.011
6	G6PD	0.603	ELF1B	1.178	UBC2	0.484	ELF1B	1.192
7	CYP2	0.676	CYP2	1.919	G6PD	0.706	TUB	2.066
8	ELF1B	0.821	TUB	5.426	TUB	2.352	ACT11	2.485
<b>FN</b>	ACT11 e TUB (0.305)		ACT11 e TUA5 (0.340)		ACT11 e ELF1A (0.153)		ELF1A e G6PD (0.522)	
Classificação	Caule (desenvolvimento)		Folha (desenvolvimento)		Soja com nematoide		Soja com inseto	
	Gene	Estabilidade	Gene	Estabilidade	Gene	Estabilidade	Gene	Estabilidade
1	UBC2	0.150	ELF1A	0.406	ACT11	0.339	ELF1B	0.180
2	ACT11	0.229	ACT11	0.424	ELF1A	0.825	G6PD	0.208
3	ELF1A	0.465	ELF1B	0.600	ELF1B	1.164	ELF1A	0.213
4	CYP2	0.551	TUA5	0.672	TUB	1.265	CYP2	0.273
5	TUA5	0.609	CYP2	0.734	G6PD	1.687	UBC2	0.277
6	G6PD	0.635	TUB	0.779	TUA5	1.718	TUA5	0.310
7	TUB	0.743	UBC2	0.960	UBC2	2.451	ACT11	0.325
8	ELF1B	0.938	G6PD	2.919	CYP2	3.543	TUB	0.839
<b>FN</b>	ACT11 e UBC2 (0.165)		ACT11 e ELF1A (0.412)		ACT11 e ELF1A (0.581)		ELF1A e G6PD (0.125)	

Genes de referência são utilizados rotineiramente para estudos de expressão gênica. O gene de referência ideal é aquele que possui uma razão de expressão idêntica em todas as amostras estudadas e que não é influenciado por tratamentos exógenos. A normalização baseada na utilização de vários genes de referência tem sido a abordagem mais utilizada para correção na quantidade de material inicial e para a correção de variações por fatores exógenos, considerando que a variação na média de múltiplos genes é menor do que a variação de genes individuais. Por esse motivo, nós escolhemos o programa geNorm como o método mais adequado para a normalização dos genes-alvo nos nossos experimentos.



**Figura 12. Variação par a par dos genes de referência candidatos gerados pelo programa geNorm.** No eixo y estão os valores calculados para a variação par a par dos genes testados e no eixo x estão os pares de genes.

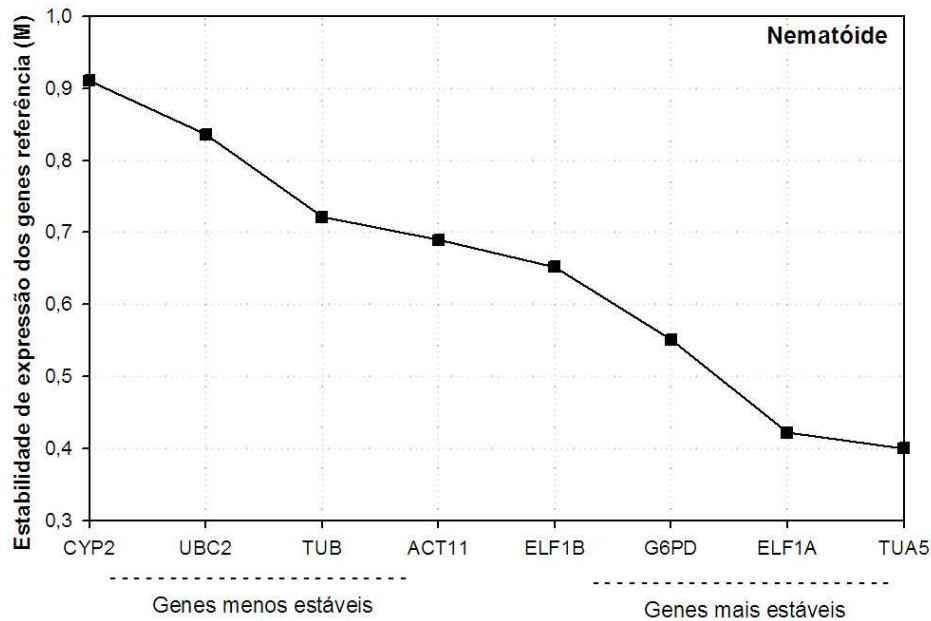
#### 4.4.2 – Genes de referência em galhas de soja infectada pelo nematoide *M. incognita*

Fitonematoides endoparasitas do solo induzem extensas modificações na expressão gênica das plantas. Os juvenis de segundo estágio (J2) penetram nas raízes e migram até o cilindro central, onde secretam proteínas através das glândulas esofageanas, induzindo a formação de um novo tipo celular. As células induzidas ficam metabolicamente ativas e sofrem ciclos de divisão celular desacoplados da citocinese, formando, assim, células gigantes. Estas células são multinucleadas e sofrem extensa modificação no seu perfil de

expressão gênica e no metabolismo celular, modificando, dessa forma, a expressão de vários genes.

Vários estudos de expressão gênica, com abordagens de interação compatível e incompatível na interação planta-nematoide, têm sido conduzidos por vários grupos de pesquisa. Entretanto, não existe até o momento nenhum trabalho de validação de genes referência em soja para estudos de expressão gênica na interação planta-nematoide. Alguns estudos foram conduzidos utilizando a técnica de Microdissecação de Captura a Laser (LCM) em células gigantes, visando excluir a necessidade do uso de genes normalizados para quantificar a expressão gênica (FOSU-NYARKO et al., 2009; HE et al., 2005; KLINK et al., 2007). Entretanto, essa técnica não está disponível para todos os centros de pesquisa.

Os tecidos coletados para a análise dos melhores genes de referência em galha foram: extremidade mediana/final da raiz, após 7 dias de inoculação e galhas após 14, 21 e 28 d.a.i. Uma região equivalente foi coletada para constituir o controle não-inoculado. Segundo o programa geNorm, os genes mais estáveis para normalização, considerando as oito amostras (inoculado e não-inoculado, nos quatro tempos), foram TUA5, ELF1A, G6PD e ELF1B (Figura 13). De acordo com os valores de variação par a par, apenas esses quatro genes são necessários para uma normalização precisa. O gene CYP2 apresentou um alto valor M, indicando que a estabilidade desse gene é baixa. De acordo com os experimentos de microarranjo depositados na plataforma Genevestigator, esse gene é altamente ativado em raízes infectadas, tanto por nematoide de cisto quanto por nematoide de galha. Nossos experimentos complementaram a análise desse gene, mostrando que ele é ativado em galha de soja infectada pelo nematoide *M. incognita*.



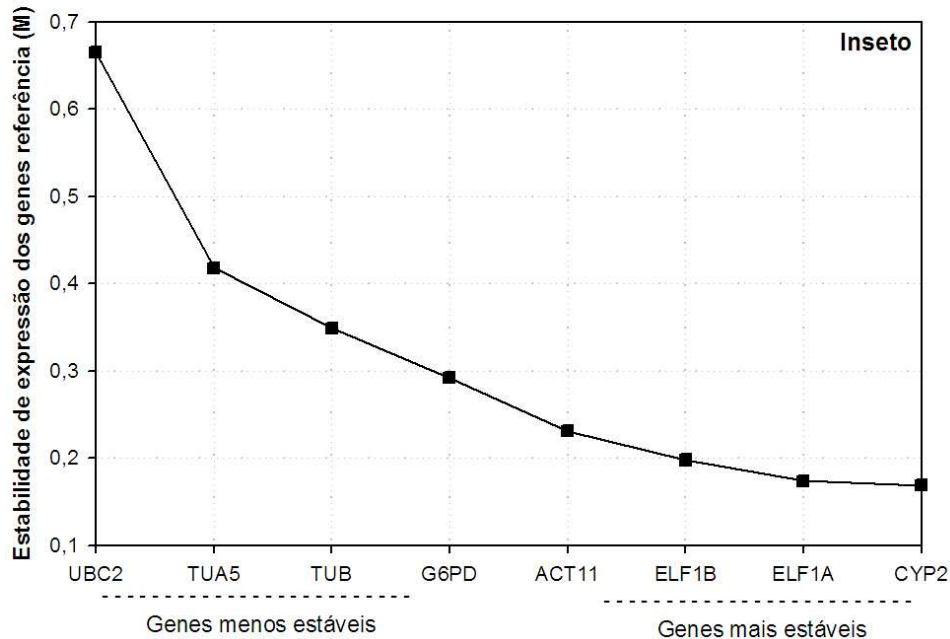
**Figura 13.** Valor de estabilidade de expressão dos genes estudados para raiz de soja inoculada com o nematóide *M. incognita* gerado pelo programa geNorm. No eixo y está o valor de estabilidade M e no eixo x estão os genes ordenados do menos estável para o mais estável. Diferentes tecidos da planta e diferentes fases do desenvolvimento foram analisados juntos.

A análise obtida através do programa NormFinder foi conduzida considerando as amostras não-inoculada e inoculada de todos os tempos da primeira replicata biológica como grupo 1, e não-inoculada e inoculada de todos os tempos da segunda replicata biológica como grupo 2. O gene mais estável foi o ACT11, com um valor de estabilidade de 0,339 e a melhor combinação de dois genes para compor o fator de normalização foi ACT11 e ELF1A com um valor de estabilidade de 0,581 (Tabela 5). O gene ELF1A está em segundo lugar na classificação fornecido pelos dois programas, indicando que ele foi estavelmente expresso entre os tratamentos e nas duas replicatas biológicas.

#### 4.4.3 – Genes de referência em folha de soja submetida ao ataque da lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*)

Todos os genes analisados apresentaram uma alta estabilidade em folhas após o ataque de *A. gemmatalis*, com valores M abaixo de 0,7; entretanto, os dois genes mais estáveis foram CYP2 e ELF1A (Figura 14). De acordo com os valores de variação par a par, apenas esses dois genes são necessários para uma normalização precisa. Para a análise no programa

NormFinder, foram considerados todos os tratamentos da primeira replicata biológica como grupo 1 e os tratamentos da segunda replicata biológica como grupo 2. O gene ELF1B foi o gene mais estável, e os genes ELF1A e CYP2, indicados com os mais estáveis pelo geNorm, estão em segundo e terceiro lugares, respectivamente, na classificação feita pelo NormFinder.

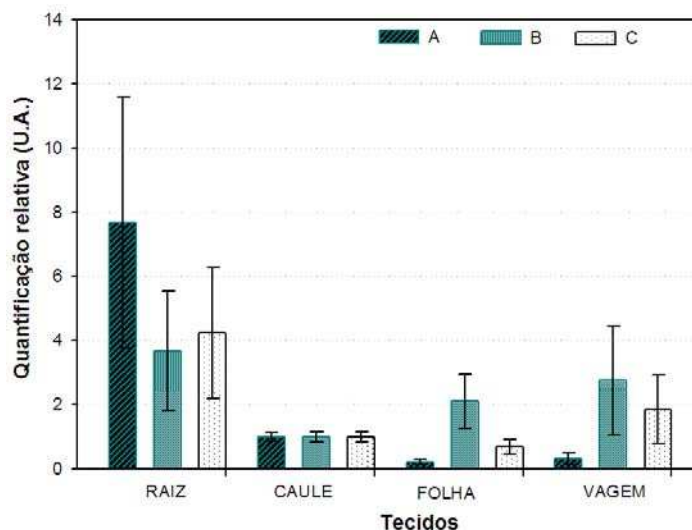


**Figura 14.** Valor de estabilidade de expressão dos genes estudados para folha submetida ao ataque de lagarta-da-soja gerado pelo programa geNorm. No eixo y está o valor de estabilidade M, e no eixo x estão os genes ordenados do menos estável para o mais estável. Diferentes tratamentos foram analisados juntos.

#### 4.4.4 – Expressão relativa do gene *RB7* para validação dos genes referência selecionados

O padrão de expressão gênica do gene *RB7* nos diferentes tecidos no estágio R4 foi verificado utilizando os genes de referência selecionados. O gene *RB7* é um gene tecido-específico de raiz e responsivo ao ataque de nematoides de galha. Uma característica principal de genes tecido-específicos é a capacidade de direcionar a altos níveis de expressão gênica somente em um tecido, com baixo ou nenhum nível de expressão nos demais tecidos da planta. Quando a expressão do gene *RB7* foi analisada, utilizando os três genes mais estáveis (ACT11, CYP2 e ELF1A) apontados pelo geNorm, foi possível verificar o padrão de expressão tecido-específico de raiz. Um resultado semelhante foi verificado quando a análise foi reconduzida utilizando-se os genes de referência G6PD e UBC2. Entretanto, a expressão em raiz foi menor do que o padrão de expressão visto utilizando os três genes mais estáveis.

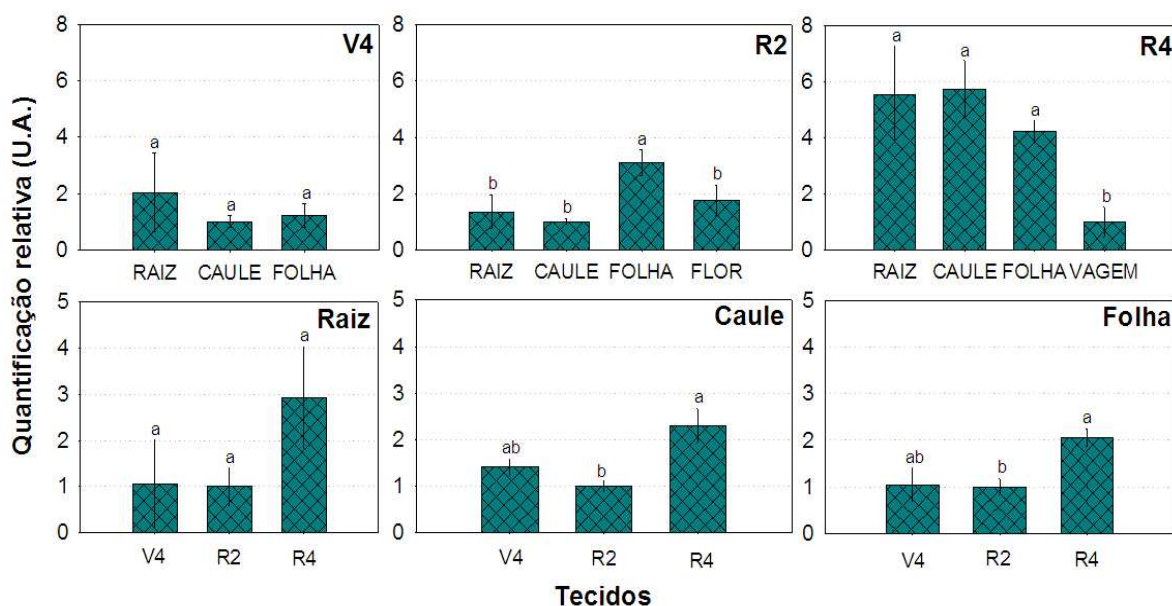
Quando a análise foi realizada utilizando-se somente um gene para a normalização (G6PD), não foi possível observar o padrão de expressão tecido-específico do gene *RB7* (Figura 15).



**Figura 15. Quantificação relativa do gene *RB7* utilizando os genes referência selecionados para a normalização.** Diferentes tecidos no estágio R4 foram analisados. Normalização utilizando os genes: (A) ACT11, CYP2 e ELF1A; (B) somente o gene G6PD; (C) G6PD e UBC2.

#### 4.5 – Análise espacial e temporal da expressão de *E2* em soja

Os dados brutos obtidos nas corridas de qPCR foram inseridos no programa qBASE plus para análise da expressão relativa da enzima de conjugação a ubiquitina. De acordo com os dados obtidos, o gene *E2* apresentou um padrão de expressão estável entre os tecidos (raiz, caule e folha) nos estádios V4 e R2, sem diferença significativa (Figura 16 – V4). No estágio R2, ele apresentou uma expressão maior em folha (duas vezes), quando comparado com os demais tecidos (Figura 16 – R2). Esses dados confirmam o padrão de expressão constitutiva do promotor UceS8.3, através do direcionamento da expressão do gene *uidA* (GUS) em plantas transformadas de *A. thaliana* (GROSSI DE SA et al., 2010). Já no estágio R4, especificamente, o nível de expressão do gene *E2* foi mais alto, quando comparado com a expressão de *E2* nos estádios anteriores, exceto em vagem, que apresentou um nível de expressão similar aos demais tecidos, provavelmente devido a esse tecido ter sido recentemente formado (Figura 16 – R4). Esse aumento foi pequeno (cerca de cinco vezes), provavelmente devido à planta ainda estar no estágio R4, período de enchimento dos grãos, iniciando o processo de senescência, que alcança o seu maior nível nos estádios R7 e R8.



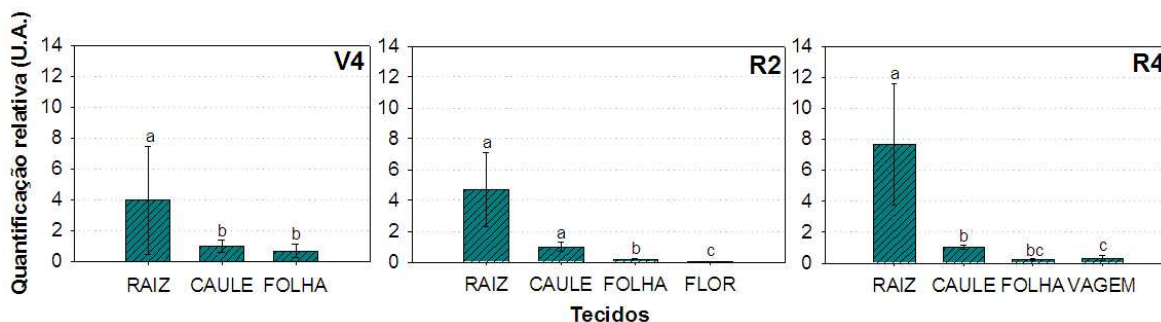
**Figura 16. Análise espacial e temporal da expressão de *E2* pelo programa qBASE plus.** No eixo X estão todos os tecidos e tempos analisados. No eixo Y estão os valores de expressão relativa (U.A. - Unidade Arbitrária). Genes de referência utilizados: (**V4**) *ELF1A*, *TUA5* e *UBC2*; (**R2**) *ELF1B*, *G6PD*, *ACT11* e *CYP2*; (**R4**) *ACT11*, *CYP2*, *ELF1A*; (**Raiz**) *TUB* e *CYP2*; (**Caule**) *ELF1B*, *G6PD* e *CYP2*; (**Folha**) *ELF1B* e *ACT11*. Estatística (V4) R-C, P = 0,497; R-F, P = 0,639; C-F, P = 0,608. (R2) R-C, P = 0,204; R-F, P = 0,012; R-FL, P = 0,487; C-F, P = 0,000; C-FL, P = 0,093; F-FL, P = 0,019. (R4) R-C, P = 0,988; R-F, P = 0,414; R-V, P = 0,019; C-F, P = 0,835; C-V, P = 0,015; F-V, P = 0,013. (Raiz) V4-R2, P = 0,370; V4-R4, P = 0,651; R2-R4, P = 0,280. (Caule) V4-R2, P = 0,054; V4-R4, P = 0,101; R2-R4, P = 0,014. (Folha) V4-R2, P = 0,977; V4-R4, P = 0,167; R2-R4, P = 0,008.

Esse aumento de expressão no final do ciclo é desejável para plantas geneticamente modificadas utilizando promotores constitutivos. O promotor mais utilizado para esse fim é o 35S de CaMV, que, por sua vez, tem sido extensivamente criticado devido a relatos de declínio nos níveis de expressão do transgene com a idade da planta bem como nos diferentes tecidos da planta (BAKSHSH et al., 2009).

Com base nos dados de expressão do gene *RB7* em fumo presentes na literatura, utilizamos o par de oligonucleotídeos para o ortólogo desse gene em soja com a finalidade de comparar o perfil de expressão desse gene conhecido com o gene *E2* em diferentes tecidos de soja e em raízes inoculadas com nematoide. A expressão do gene *RB7* é sempre alta em raiz e pequena ou inexistente em outros tecidos (Figura 18). Uma expressão quatro vezes maior foi observada em raiz, quando comparado com caule no estágio R2, e uma expressão de 250 e 345 vezes foi observada em raiz, quando comparada com flor nos estádios V4 e R2, respectivamente (figura não apresentada), demonstrando que a expressão em raiz é muito maior do que a expressão nos outros tecidos (padrão de expressão tecido-específico).

Quando comparada a expressão dos genes *E2* e *RB7* em raiz, verifica-se que eles não apresentam diferença significativa nos estádios V4 e R2. Entretanto, o gene *E2* foi três vezes mais expresso em raiz do que o gene *RB7* no estágio R4 (figura não apresentada), indicando

que o nível de expressão do gene *E2* é alto e equivalente ao nível de expressão do gene *RB7* (o promotor do gene *RB7* tem sido frequentemente indicado na literatura como um bom promotor para direcionamento de genes contra nematoides), de forma que este poderia ser utilizado para direcionar transgenes em raiz de plantas geneticamente modificadas.

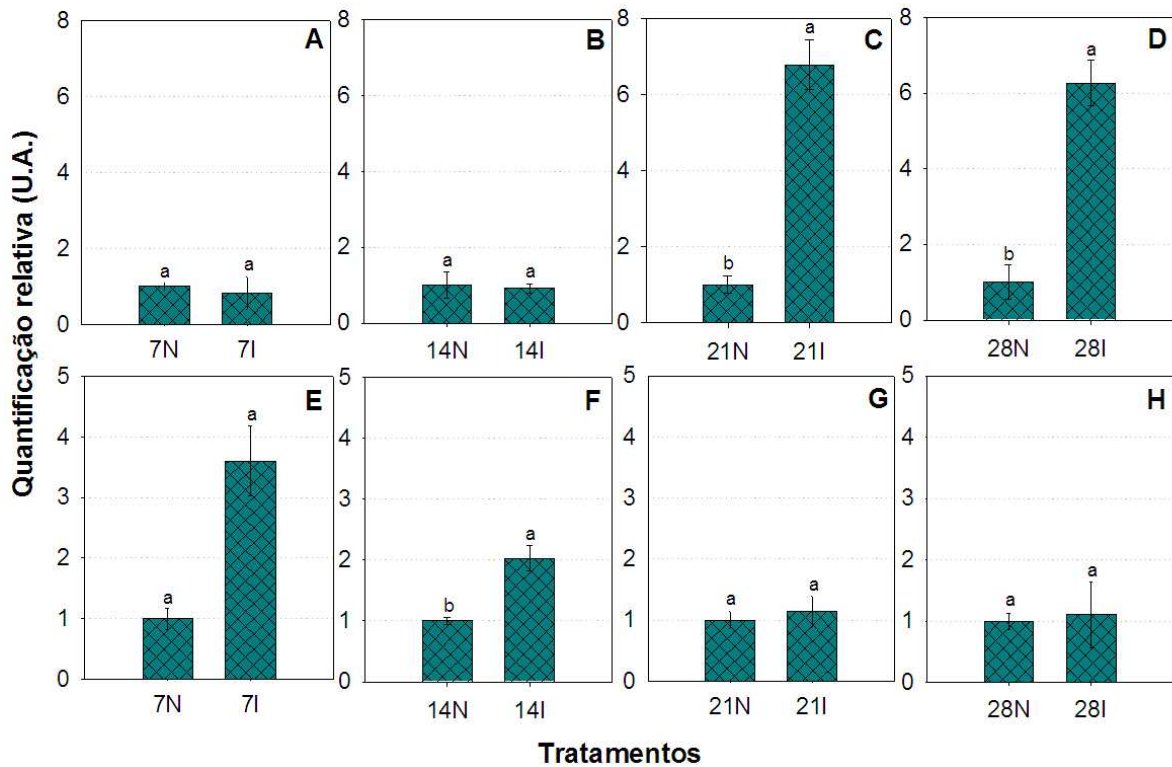


**Figura 17. Análise espacial e temporal da expressão relativa do gene *RB7* específico de raiz pelo programa qBASE plus.** No eixo X estão todos os tempos e tecidos analisados. No eixo Y estão os valores de expressão relativa (U.A - Unidade Arbitrária). Genes de referência utilizados: (**V4**) *ELF1A*, *TUA5* e *UBC2*; (**R2**) *ELF1B*, *G6PD*, *ACT11* e *CYP2*; (**R4**) *ACT11*, *CYP2*, *ELF1A*. Estatística (V4) R-C,  $P = 0,021$ ; R-F,  $P = 0,029$ ; C-F,  $P = 0,605$ . (R2) R-C,  $P = 0,176$ ; R-F,  $P = 0,002$ ; R-FL,  $P = 0,000$ ; C-F,  $P = 0,001$ ; C-FL,  $P = 0,000$ ; F-FL,  $P = 0,022$ . (R4) R-C,  $P = 0,000$ ; R-F,  $P = 0,001$ ; R-V,  $P = 0,000$ ; C-F,  $P = 0,171$ ; C-V,  $P = 0,031$ ; F-V,  $P = 0,381$ .

#### 4.6 – Análise da expressão de *E2* em galhas de soja submetida à infecção por *M. incognita*

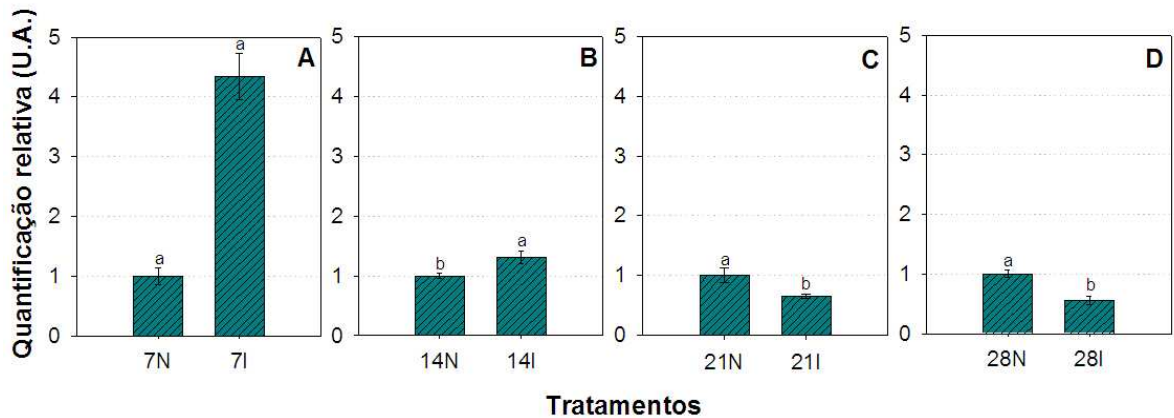
A análise foi conduzida individualmente para cada replicata biológica, com o objetivo de mostrar que os diferentes resultados obtidos indicam variações no tempo que os juvenis (J2) levaram para penetrar a raiz e estabelecer o sítio de alimentação. Na primeira replicata biológica, o gene *E2* não apresentou diferença significativa em galha, quando comparado com o controle após 7 e 14 d.a.i (Figura 18 A). No entanto, ele foi cerca de sete vezes mais expresso em galha aos 21 d.a.i e cerca de seis vezes mais expresso em galha após 28 d.a.i (Figura 18 C e D). Na segunda replicata biológica, a expressão do gene *E2* foi três vezes maior em galha, quando comparado com o controle aos 7 d.a.i. Entretanto, essa diferença não foi significativa de acordo com a análise estatística, tendo como parâmetro  $P = 0,05$  (Figura 18 E). Aos 14 d.a.i o gene *E2* mostrou ser duas vezes mais expresso em galha, quando comparado com o controle (Figura 18 F).





**Figura 18. Análise da expressão relativa de *E2* em raiz de soja infectada pelo nematoide *M. incognita* pelo programa qBASE plus.** No eixo X estão os tratamentos analisados e no eixo Y estão os valores de expressão relativa (U.A - Unidade Arbitrária). Primeira replicata biológica (A-D). Segunda replicata biológica (E-H). Os genes de referência utilizados foram TUA5, ELF1A, G6PD e ELF1B para as duas replicatas biológicas. Estatística (A) P = 0,365; (B) P = 0,892; (C) 0,024; (D) P = 0,000; (E) P = 0,066; (F) P = 0,035; (G) P = 0,641; (H) P = 0,893.

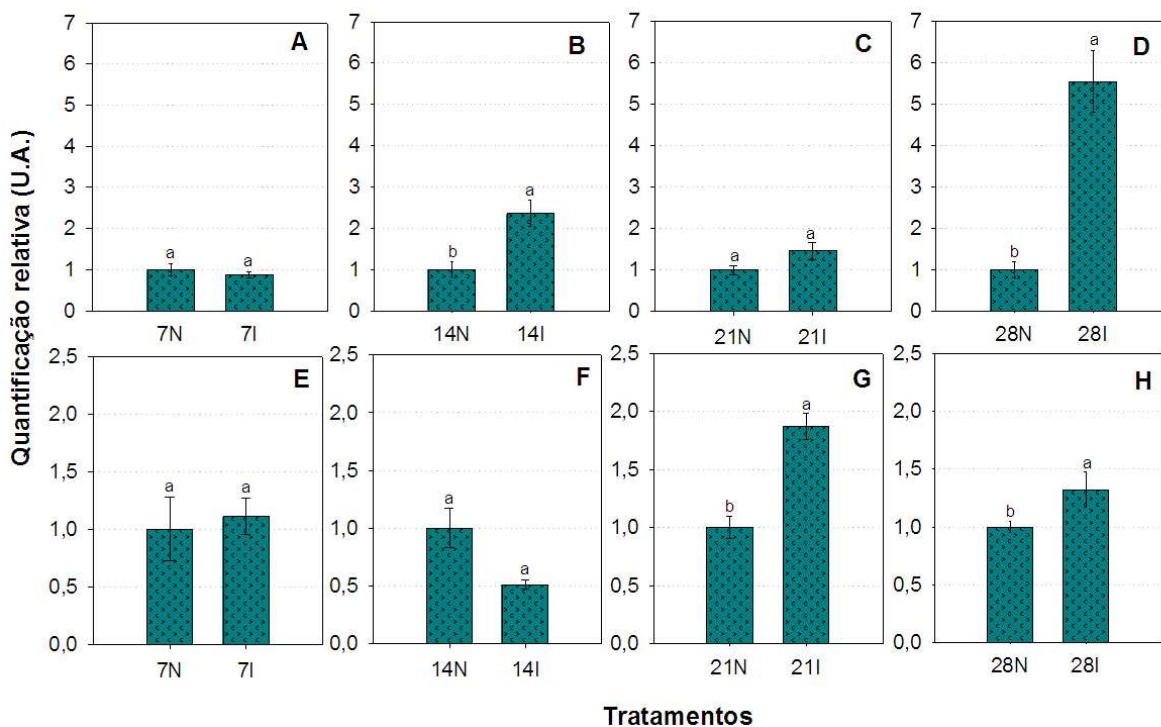
O gene *RB7* foi analisado apenas em uma replicata biológica devido aos resultados de uma das replicatas ter apresentado uma curva de amplificação ruim e uma eficiência muito baixa. De acordo com os resultados obtidos, o gene *RB7* apresentou uma alta expressão nos estágios iniciais da infecção, sendo a ativação cerca de duas vezes e meia aos 7 d.a.i e uma vez aos 14 d.a.i (Figura 19 A e B). Quando comparado os níveis de expressão dos genes *E2* e *RB7*, observa-se que os dois genes possuem uma ativação nos estágios iniciais de infecção; entretanto, apenas o gene *RB7* foi reprimido nos estágios tardios de infecção, sendo a expressão do gene *E2* equivalente ao controle não infectado (figura não apresentada).



**Figura 19. Análise da expressão relativa do gene *RB7* em raiz de soja infectada pelo nematoide *M. incognita* pelo programa qBASE plus.** No eixo X estão os tratamentos analisados, e no eixo Y estão os valores de expressão relativa (U.A - Unidade Arbitrária). Os genes de referência utilizados foram TUA5, ELF1A, G6PD e ELF1B. Estatística (A)  $P = 0.66$ ; (B)  $P = 0.048$ ; (C)  $P = 0.027$ ; (D)  $P = 0.000$ .

O gene *CYP2*, utilizado inicialmente nesse estudo como gene referência, apresentou uma expressão seis vezes maior em galha do que no controle após 28 d.a.i na primeira replicata biológica (Figura 20 D). Na segunda replicata, a ativação ocorreu após 21 e 28 d.a.i, indicando que esse gene é ativado na planta em resposta ao estresse de infecção do nematoide (Figura 20 G e H). Quando comparado a expressão dos genes *E2* e *CYP2*, foi possível observar que aos 14 d.a.i, da primeira replicata, o gene *CYP2* foi 2,5 vezes maior em galha do que o gene *E2* (que manteve uma expressão constante entre os tratamentos inoculado e não inoculado).

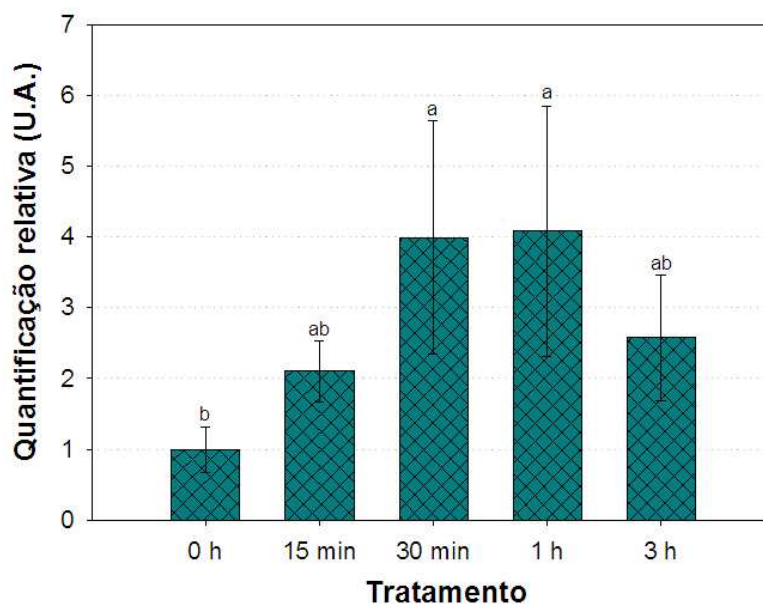
O gene *CYP2* codifica um ciclofilina com atividade de peptidil-prolil *cis-trans* isomerase atuando no correto dobramento das proteínas. Essa proteína, embora tenha uma função essencial no crescimento das células, pode ser classificada como uma proteína de estresse (chaperona molecular), sendo altamente induzida por choque térmico e outros estresses ambientais (KUREK et al., 1999). Uma das principais funções de chaperonas moleculares é auxiliar o correto dobramento das proteínas não permitindo a exposição de “degrons”, evitando a formação de agregados, que levam à degradação proteolítica.



**Figura 20. Análise da expressão relativa do gene *CYP2* em raiz de soja infectada pelo nematoide *M. incognita* pelo programa qBASE plus.** No eixo X estão os tratamentos analisados, e no eixo Y estão os valores de expressão relativa (U.A - Unidade Arbitrária). Primeira replicata biológica (A-D). Segunda replicata biológica (E-H). Os genes de referência utilizados foram TUA5, ELF1A, G6PD e ELF1B para as duas replicatas biológicas. Estatística (A)  $P = 0,380$ ; (B)  $P = 0,000$ ; (C)  $0,580$ ; (D)  $P = 0,000$ ; (E)  $P = 0,665$ ; (F)  $P = 0,089$ ; (G)  $P = 0,011$ ; (H)  $P = 0,035$ .

#### 4.7 – Análise da expressão de *E2* em folha de soja submetida ao ataque da lagarta-da-soja (*A. gemmatilis*)

O padrão de expressão do gene *E2* em folhas submetidas ao ataque da lagarta-da-soja foi cerca quatro vezes maior após 30 minutos e uma hora, quando comparado com o controle sem lagartas. Um aumento pequeno pode ser observado após 15 minutos e três horas após o ataque; entretanto, esse aumento não é significativo quando comparado com o controle. Genes em resposta a estresse de ferida mecânica ou por herbivoria, geralmente são ativados cerca minutos ou horas após o dano (WALLEY et al., 2007). Esses genes geralmente possuem a função de reparar o dano no tecido, produzir substâncias que inibam o crescimento do inseto predador (ex. inibidores de proteases) e ajustar o metabolismo da planta para as demandas nutricionais impostas.



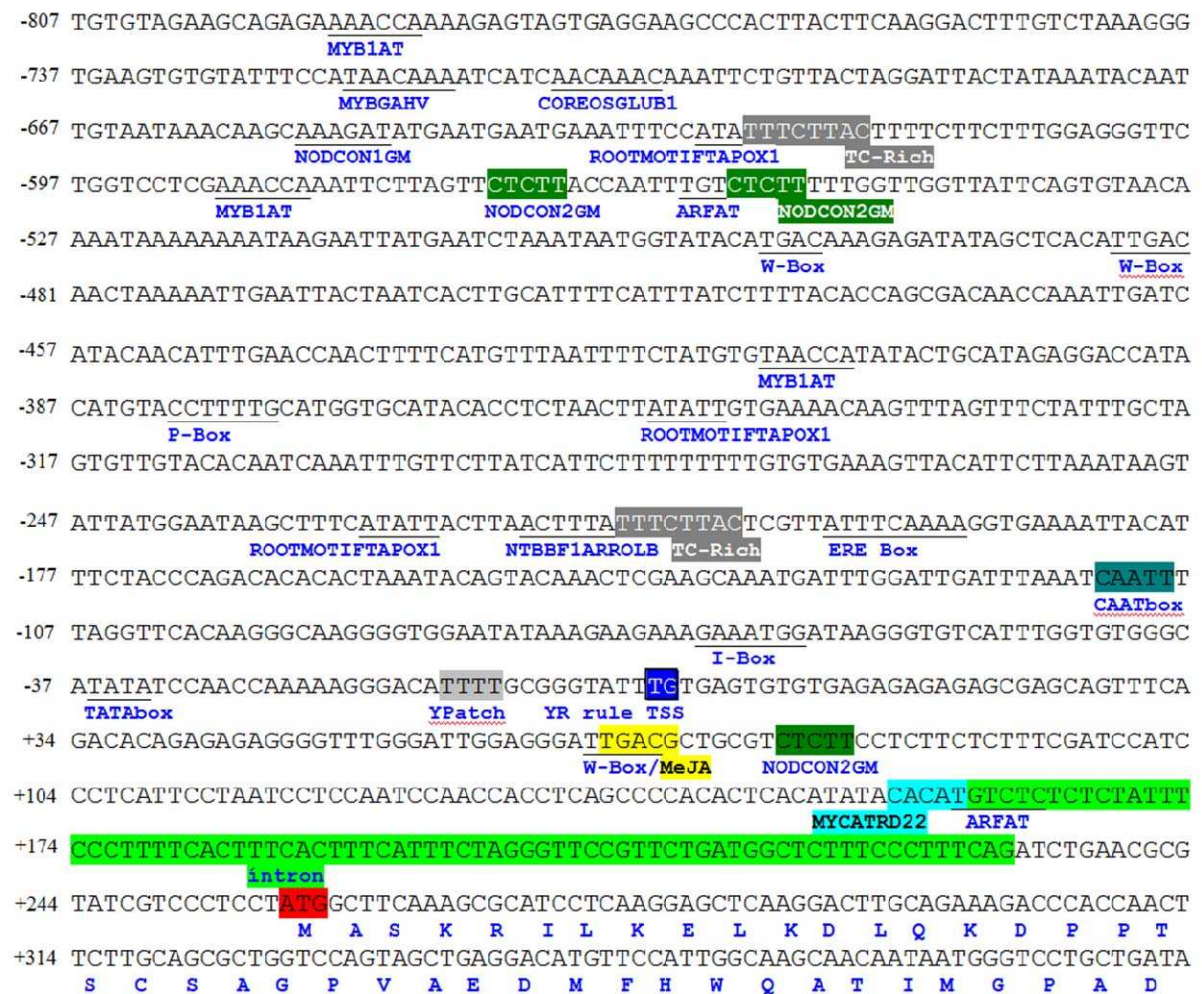
**Figura 21. Análise da expressão relativa do gene *E2* em folha submetida ao ataque da lagarta-da-soja (*A. gemmatilis*) pelo programa qBASE plus.** No eixo X estão os tratamentos analisados, e no eixo Y estão os valores de expressão relativa (U.A - Unidade Arbitrária). Os genes de referência utilizados foram CYP2 e ELF1A. Estatística (0h/15m) P = 0,134; (0h/30m) P = 0,040; (0h/1h) P = 0,043; (0h/3h) P = 0,426; (15m/30m) P = 0,154; (15m/1h) P = 0,179; (15m/3h) P = 0,818; (30m/1h) P = 0,035; (30m/3h) P = 0,102; (3h/1h) P = 0,105.

#### 4.8 – Análise de prováveis *cis*-elementos no promotor UceS8.3

A região proximal, também denominada “core”, contém elementos para a expressão basal do gene, indicando o local e o sentido onde a transcrição deve ser iniciada. No promotor UceS8.3, o possível sítio de início da transcrição foi identificado (posição +1) e segue a regra YR identificada por Yamamoto em 2007, em que a maioria dos TSSs são A ou G e a posição -1 é provável que seja C ou T. Esta regra YR aplica-se para 77% dos promotores de *A. thaliana*, indicando uma frequência grande para elementos aleatórios (YAMAMOTO et al., 2007). O TATAbox, contendo a sequência consenso TATAAA, foi encontrado a -33 nucleotídeos do TSS, ele é responsável pelo primeiro passo na formação do complexo de iniciação da transcrição, nele se liga o fator de transcrição TFIID. O elemento CAATbox, relatado aumentar os níveis de transcrição gênica, foi encontrado entre -113 e -109 nucleotídeos do TSS (Figura 22). A região entre +160 e +132 representa um íntron (caixa verde-claro), iniciando com GT e terminando AG, além de conter uma sequência rica em T, característica de íntrons de plantas, sendo essas regiões críticas para o seu eficiente *splicing* (GOODALL e FILIPOWICZ, 1989; LUEHRSEN e WALBOT, 1994; SAMADDER et al.,

2008). Esse íntron foi previamente caracterizado em nosso laboratório como sendo responsável por conferir altos níveis de transcrição do gene repórter *uidA* em plantas de *A. thaliana* transformadas (resultados não publicados). Trabalhos anteriores relataram que os altos níveis de expressão gênica direcionados por promotores de poliubiquitinas está relacionado, quantitativamente, com a presença de um íntron localizado dentro da região 5' UTR (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Vários outros trabalhos têm demonstrado que íntrons perto do códon de iniciação da tradução são importantes *cis*-elementos responsáveis por aumentar a expressão gênica em plantas (CALLIS et al., 1987; LEHIR et al., 2003).

A região distal contém *cis*-elementos que regulam a expressão espacial-temporal e regulada por estímulos internos ou externos. Vários *cis*-elementos foram encontrados no promotor UceS.8.3, incluindo elemento responsivo a etileno (ERE-box) contendo a sequência ATTTCAA, localizada entre -200 e -192 (Figura 22). Este *cis*-elemento foi encontrado no promotor do gene codificador da glutatona S-transferase, que é ativado em resposta a senescência de pétalas em plantas de cravos (ITZHAKI et al., 1994). O aumento do etileno que acompanha a senescência da pétala é um processo essencial para a transcrição desse gene. O etileno é um hormônio vegetal envolvido na regulação do crescimento de plantas e na resposta de defesa da planta a estresses bióticos e abióticos (TAPIA et al., 2005).



**Figura 22. Análise do promotor UceS8.3 através dos bancos PLACE e PLANTCARE. Promotor basal** – (TSS) representa o provável sítio de início da transcrição, a caixa azul representa a regra YR (o TSS é A ou G e a posição -1 é C ou T) (YAMAMOTO et al., 2007). O CAATbox está na posição -113 e -109 e região rica em pirimidina (Y Patch) está localizada entre o TATABox e o TSS (caixa cinza claro). **Promotor específico** – contém *cis*-elementos que controlam a expressão espacial-temporal e induzida por estímulos internos ou externos.

Três regiões contendo o *cis*-elemento W-box (sequência TGAC) foram encontradas no promotor UceS.8.3 (Figura 22). Este *cis*-elemento é um sítio para ligação de vários de fatores de transcrição da família WRKY que é encontrado em muitos promotores de genes induzidos por patógenos. O motivo W-box foi a única sequência comum a todos os promotores dos 26 genes de defesa identificados em uma análise de microarranjo que analisou mudanças na expressão gênica durante a resistência sistêmica adquirida (SAR), demonstrando a importância desse motivo na resposta de defesa da planta (MALECK et al., 2000). As proteínas WRKY apresentam um aumento de expressão e/ou uma atividade de ligação ao

DNA após a indução por uma gama de patógenos, sinais de defesa e ferida (EULGEM et al., 2000). Algumas proteínas WRKY também são induzidas durante a senescência foliar, consistente com outros estudos que demonstram que existe uma sobreposição entre o perfil de expressão gênica durante a senescência e durante o estresse biótico (HINDERHOFER e ZENTGRAF, 2001; ROBATZEK e SOMSSICH, 2001).

O *cis*-elemento MYB1AT (WAACCA) localizado em três regiões do promotor é responsável pelo reconhecimento do fator de transcrição MYB. O *cis*-elemento MYCATRD22 (CACATG), localizados entre +155 e +159, é responsável pelo reconhecimento do fator de transcrição MYC (Figura 23). Ambos os elementos estão envolvidos na sinalização de estresse hídrico ativado pelo hormônio ácido abscísico. Esse hormônio é produzido em condições de déficit hídrico, causando o fechamento dos estômatos, e está envolvido na ativação de vários genes induzidos por seca. O gene *rd22*, por exemplo, é um gene induzido por seca e pela aplicação exógena de ABA e contém os dois elementos anteriormente relatados para o reconhecimento de MYB e MYC no seu fragmento promotor de 67 pb (ABE et al., 1997).

Outra sequência relacionada a estresse é o motivo TC-rich com a sequência TTTCTTAC, encontrada duas vezes no promotor (Figura 22). Essa sequência foi identificada como um elemento responsivo a estresse e defesa do gene codificador da peroxidase aniônica em *Nicotiana tabacum* (DIAZ-DE-LEON et al., 1993).

Elementos responsivos a outros hormônios foram encontrados no promotor UceS8.3, incluindo: o elemento de resposta a auxina (ARFAT, também designados por AuxRE), encontrado em duas regiões do promotor e responsável pela ligação do fator *trans*-atuante ARF (HAGEN e GUILFOYLE, 2002); o elemento em resposta a giberelina P-Box, contendo a sequência rica em pirimidina conservada em genes de  $\alpha$ -amilase de cereais (SUTOH e YAMAUCHI, 2003); e o elemento em resposta a metil jasmonato (MeJA), localizado entre +67 e +71, esse elemento está relacionado com ataque de insetos e em respostas a ferida mecânica (ROUSTER et al., 1997).

Regiões para expressão tecido-específica também foram encontradas no promotor UceS8.3. Um motivo chamado ROOTMOTIFTAPOX1, contendo a sequência ATATT, foi previamente relatado estar presente na região promotora dos genes *rolD* (plasmídeos Ri da *Agrobacterium rhizogenes*) e *TTG2* (*A. thaliana*) e estão associados à expressão gênica na raiz (ELMAYAN e TEPFER, 1995; JOHNSON et al., 2002).

Também foram encontrados dois elementos NODCON1GM (AAAGAT) e NODCON2GM (CTCTT), encontrados em promotores de nodulinas (genes tecido-específicos

e ativados durante o desenvolvimento dos nódulos da raiz) (SANDAL et al., 1987). Esses elementos também foram encontrados no promotor do gene *VfLb29*, uma Leghemoglobina, transportador de O<sub>2</sub> específico do nódulo, que é expressa nas células infectadas pouco antes do início da fixação de nitrogênio (FEHLBERG et al., 2005). Uma vez que o parasitismo por *M. incognita* utiliza vias de sinalização celular semelhantes aos rizóbios (BIRD, 2004), a presença desses *cis*-elementos no promotor UceS8.3 pode estar relacionada ao aumento de expressão de *E2* observado em raízes inoculadas. Outro motivo envolvido no controle da expressão tecido-específica é o COREOSGLUB1 (AACAAAC), responsável pela expressão específica de endosperma (WU et al., 2000), e o motivo I-Box (GATAAGG), encontrado em muitos promotores regulados por luz, tanto em mono como em dicotiledôneas (TERZAGHI e CASHMORE, 1995) (Figura 22). Esse motivo é encontrado freqüentemente em genes tecido-específico de folhas.

Os *cis*-elementos encontrados no promotor UceS8 podem estar relacionados com o perfil de expressão do gene *E2* encontrado nos ensaios, com certa tecido-especificidade e certa indução após os estresses bióticos testados.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 – Validação de genes referência

PCR quantitativo em tempo real é uma técnica muito sensível, frequentemente usada para quantificar pequenas variações na expressão gênica. Entretanto, essas variações entre as amostras podem não ser devido ao padrão de expressão gênico diferencial, mas devido a erros na normalização do gene alvo. As variações entre as amostras podem ocorrer devido a diferente quantidade e qualidade do material inicial, preparação do RNA, síntese do cDNA, erros de diluições e pipetagem (JIAN et al., 2008). Visando obter genes de referência para uma precisa análise da expressão do gene *E2*, oito genes de referência clássicos foram analisados quanto a sua expressão em diferentes tecidos de soja, em séries de desenvolvimento para raiz, caule, folha, e para raiz e folha submetida a estresses bióticos.

Várias abordagens tem sido utilizadas para análise de estabilidade da expressão de genes referência, como abordagens de  $\Delta Ct$ , índice de estabilidade, *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*. Neste trabalho, foi utilizado os programas *geNorm* e *NormFinder* para a escolha dos melhores genes de referência nas condições estudadas. A classificação fornecida pelos dois programas não foi a mesma, devido aos diferentes modelos estatísticos dos programas, mas resultados similares foram obtidos. No estágio R4, por exemplo, os genes ACT11, CYP2 e ELF1A foram indicados pelo programa *geNorm* como os genes mais estáveis, e esses três genes também estão entre os quatro genes mais estáveis apontados pelo programa *NormFinder*. O mesmo aconteceu em folha na série de desenvolvimento da planta, em que os genes ELF1B e ACT11 foram apontados, por ambos os programas, como genes de referência estáveis.

Os genes mais estáveis em diferentes tecidos numa mesma fase do desenvolvimento foram os genes ACT11 e ELF1A, de acordo com os dois programas. O gene ACT11 também foi indicado por Ruibo (2009) como um bom gene de referência para a normalização em diferentes tecidos de soja (HU et al., 2009). Esse resultado foi diferente do resultado obtido por Jian (2008), no qual os genes ACT11 e ELF1A estão em sexto e sétimo lugar na classificação gerada pelo *geNorm*. Entretanto, o gene G6PD, indicado como um controle interno inapropriado por esse autor, também apresentou uma estabilidade muito baixa, tanto para diferentes tecidos quanto para a série de desenvolvimento da soja. Na série de desenvolvimento, os genes mais estáveis foram os genes CYP2, ELF1B e ELF1A.

Os genes ACT e TUB têm sido utilizados com frequência em trabalhos de expressão gênica com soja (CASTEEL et al., 2008; KAMAUCHI et al., 2008; NONTACHAIYAPOOM et al., 2007; PANTHEE et al., 2006; YIN et al., 2010). De acordo com Ruibo (2009), 43% dos trabalhos com soja presentes no “PubMed” (período de 2001 a 2009) utilizam o gene TUB como gene referência, 28% utilizam o gene ACT e cerca de 11% utilizam o gene 18SrRNA.

Entre os dois experimentos de estresse biótico, os genes mais estáveis foram os genes ELF1A e ELF1B. Resultado similar foi obtido em plantas de batata submetidas a estresses bióticos e abióticos, em que o ELF1A foi o mais estável em todas as condições testadas (NICOT et al., 2005). Considerando todos os experimentos realizados, o gene ELF1A foi o mais estável em todos os tratamentos. O pior gene referência em todos os experimentos foi o gene TUB. Esse gene também foi apontado como um gene de referência ruim em trabalhos de validação em plantas de batata, uva e soja (JIAN et al., 2008; NICOT et al., 2005; REID et al., 2006).

Os genes de referência utilizados nesse estudo foram investigados na plataforma Genevestigator, utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo. Os genes foram analisados quanto a sua estabilidade de expressão em diferentes órgãos, em séries de desenvolvimento da planta-modelo e nos tratamentos com nematoide de galha (*M. incognita*) e com nematoide de cisto (*Heterodera schachtii*). Todos os genes apresentaram uma boa estabilidade nos experimentos investigados, sendo os genes ELF1A e ELF1B os genes mais estáveis nas quatro situações, confirmando a validação dos genes obtidos nesse trabalho. Nos experimentos com nematoides presentes no banco Genevestigator, o gene CYP2 também apresentou uma ativação nas raízes infectadas tanto por nematoide de cisto quanto por nematoides de galha, sendo esse último nos estágios mais tardios da infecção (ANEXO 4).

O número de genes referência para uma normalização precisa também foi verificado nesse trabalho. Foi possível observar que, ao utilizar somente um gene de referência para a normalização, o padrão de expressão tecido-específico do gene *RB7* foi alterado, indicando que mais genes são necessários para compor o fator de normalização garantindo uma normalização precisa.

Esses resultados mostram que, apesar da indicação dos melhores genes de referência por literatura específica, uma validação prévia dos genes de referência nas condições experimentais realizadas é necessária.

## 5.2 – Análise da expressão do gene *E2* controlado pelo promotor UceS8.3

O gene *E2* demonstrou ser estavelmente expresso em diferentes tecidos de soja durante o estágio vegetativo e reprodutivo, sendo detectado um pequeno aumento em folhas no estágio reprodutivo R2 (Figura 16). Esse padrão de expressão está intimamente relacionado com a capacidade do seu promotor de direcionar altos níveis de expressão gênica em todos os órgãos. O promotor do gene *E2*, UceS8.3, é um forte promotor constitutivo capaz de direcionar uma maior expressão de GUS, em diferentes tecidos (raiz, caule, folha e botão floral), quando comparado ao promotor comercial CaMV35S otimizado (regiões regulatórias duplicadas e junto com o *enhancer* de AMV (GROSSI DE SA et al., 2010). Esse forte nível de expressão foi relacionado com a presença de um íntron (região +160 a +132) na região 5'UTR do gene *E2*. Foi verificado que a deleção dessa região diminuiu significativamente (cerca de 80 vezes) a expressão do gene repórter em todos os órgãos da planta (resultados não publicados). Hernandez (2009) constatou que a presença do íntron na região 5'UTR do gene poliubiquitina de soja é responsável por conferir altos níveis de expressão constitutiva, e a deleção desse íntron ocasionou uma menor expressão do gene repórter GFP (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Muitos íntrons têm mostrado aumentar a expressão gênica em plantas (BROWN e SIMPSON, 1998; CALLIS et al., 1987; LUEHRSEN e WALBOT, 1991, 1994). Este aumento da expressão gênica mediado por íntron (IME) em plantas apresenta-se maior em monocotiledôneas (cerca de 10 a 100 vezes) do que dicotiledôneas (normalmente de duas a dez vezes) e depende tanto da posição do íntron, quanto da sequência do íntron (BOURDON et al., 2001; CLANCY e HANNAH, 2002; ROSE, 2002). Sequências ricas em timidinas, encontradas no íntron do gene *Sh1* em plantas de milho, foram relatadas como sendo essenciais para aumentar a expressão a expressão gênica (CLANCY e HANNAH, 2002). O íntron localizado na região 5'UTR do gene *E2* também é rico em timidinas, e esse pode ser o motivo responsável pela maior expressão de GUS em plantas de *A. thaliana* transformadas.

Devido a característica de promotor constitutivo, uma possível aplicação do promotor UceS8.3 seria direcionando genes conferindo tolerância a herbicidas para o controle de plantas daninhas, assim como direcionando genes marcadores de seleção em construções gênicas para a transformação genética de plantas.

O gene TobRB7, analisado primeiramente de plantas de fumo por hibridização *in situ*, demonstrou uma expressão localizada no meristema da raiz e em regiões imaturas do cilindro central (OPPERMAN et al., 1994). A expressão espacial, analisada mediante hibridização em

gel de agarose com RNA de plantas de tabaco, mostrou que esse gene não é expresso em caule, folha jovens e folhas velhas, apenas na raiz (YAMAMOTO et al., 1991). Entretanto, nós verificamos, através de uma técnica mais precisa que esse gene apresenta uma expressão em caule e folha (muito menor do que raiz) que vai diminuindo com o desenvolvimento da planta, deixando o padrão de expressão cada vez mais tecido específico. O promotor de *RB7* tem sido freqüentemente relatado na literatura como um forte promotor específico de raiz e responsivo a nematoide. Nós verificamos que, em raiz, o padrão de expressão de *E2* foi igual ao do gene *RB7*, sendo três vezes maior no estágio R4. Também foi confirmado o padrão de expressão do gene *RB7* em resposta ao ataque do nematóide (Figura 19 A), entretanto não foi possível verificar uma ativação em resposta ao nematóide conforme relatado na literatura. Segundo HE e colaboradores (2005), a expressão do gene *RB7* em plantas de tomate infectadas com *M. javanica* foi cerca sete vezes maior em galha do que no meristema da raiz, e cerca de vinte e seis vezes maior em galha do que a expressão em células corticais (ambas as regiões, meristema e córtex, foram coletados de plantas não inoculadas) (HE et al., 2005). Eles também relataram que uma maior expressão do gene *RB7* foi verificada após três semanas após a inoculação (HE et al., 2005).

Uma ativação do gene *E2* foi verificada no final do ciclo, provavelmente pela senescência da planta (Figura 16). Em plantas de soja, após o florescimento e produção de frutos, inicia-se um processo de alteração morfológica e bioquímica na qual ocorre freqüente degradação de proteínas por proteases dependentes e independentes de ATP (MOON et al., 2004). Para isso, vários genes da via ubiquitina foram relatados ser ativados durante a senescência (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997). Essa degradação está relacionada com o dismantelamento da atividade fotossintética dentro do cloroplasto e com a remobilização de aminoácidos para outras partes da planta que estão em desenvolvimento, como as vagens (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997). Está relacionada com a morte celular programada, que também pode ocorrer em resposta a estresses bióticos, nesse caso com o objetivo de evitar que a infecção se propague pelo organismo (DEVOTO et al., 2003). Esse padrão de expressão de *E2* pode estar relacionado com a presença do elemento responsivo a etileno (ERE-box) localizado entre -200 e -192 do promotor *UceS8.3*. Esse elemento foi previamente caracterizado como uma região necessária para conferir a ativação transcricional-dependente de etileno do gene *GST1* durante a senescência de pétalas em plantas de cravos (*Dianthus caryophyllus*). Durante a senescência, ocorre um aumento na produção de etileno, essa acumulação estimula a ativação transcricional de vários genes associados com a senescência

(ex.: protease cisteínica, protease aspártica, metalotioneína, ferritina e outros) (LEMUS et al., 2000).

Devido à característica de ativação no final do ciclo, uma possível aplicação do promotor UceS8.3 seria no direcionamento de genes contra doenças fúngicas do final do ciclo (Crestamento foliar de cercóspera - *Cercospora kikuchii*, Podridão de carvão - *Macrophomina phaseolina* e Podridão de fitoptora - *Phytophthora sojae*) e contra insetos-praga como os percevejos da soja (*Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula*), devido a essas pragas causarem danos frequentes à cultura após o estágio reprodutivo (R2) até a maturação da planta.

O padrão de expressão do gene *E2* em resposta ao nematoide mostrou que esse gene é ativado em galhas de plantas de soja infectadas por *M. incognita*. Entretanto, não foi possível observar em qual período da infecção ocorre a maior expressão do gene *E2*. Uma análise foi conduzida separadamente por qualitativo RT-PCR visando verificar a expressão do gene *E2* em diferentes regiões da raiz (meio ou pontas) em plantas de soja inoculadas e não-inoculadas com o nematoide *M. incognita* (ANEXO 4). Observou-se que o gene *E2* tem uma expressão maior na ponta da raiz (se comparada com o meio) e que a expressão de *E2* vai aumentando conforme o desenvolvimento da planta (a expressão de *E2* aos 7 d.a.i em plantas não inoculadas é menor que a expressão de *E2* nos tempos seguintes 14, 21 e 28 d.a.i) (ANEXO 4). Verificou-se, também, um padrão diferenciado em raízes de plantas de *A. thaliana* transformadas, sendo a expressão de GUS mais direcionada para as pontas das raízes (região meristemática), como relatado por (BIRD, 1996).

Para a análise de *E2* por PCR em tempo real, foram coletadas as regiões da galha em plantas inoculadas com o nematoide e uma região equivalente à região da galha na planta não-inoculada. A diferença no padrão de expressão de *E2* entre as replicatas biológicas pode ser devido às variações no tempo que os juvenis (J2) levaram para penetrar a raiz e estabelecer o sítio de alimentação, assim como devido a diferentes regiões coletadas no controle não inoculado, uma vez que, dependendo da região coletada, o padrão de expressão de *E2* pode ser diferente na raiz.

Essa ativação do gene *E2* em galhas é promissora, já que vários promotores de patógenos normalmente utilizados na transformação de plantas, como o promotor 35S e os promotores de *Agrobacterium nos* (nopalina sintase), *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD*) e T-*cyt* (síntese de citocinina) foram relatados ser silenciados em sítios de alimentação de nematoides (BERTIOLI et al., 1999; GODDIJN et al., 1993; VAN POUCKE et al., 2001). A forte expressão de *E2* em galhas pode ser relacionada com a presença do motivo W-Box no

promotor necessário para a ativação da expressão gênica pelo fator de transcrição WRKY (GHEYSEN e FENOLL, 2002). O fator de transcrição AtWRKY23 é altamente expresso nas fases iniciais de estabelecimento do sítio de alimentação (GRUNEWALD et al., 2008). Este gene é induzido por auxina, sendo importante para o desenvolvimento da raiz primária e para a infecção dos nematoides (GHEYSEN e FENOLL, 2002; GRUNEWALD et al., 2008).

A auxina tem sido relatada ter um papel central na formação de sítios de alimentação de nematoides (GHEYSEN e MITCHUM, 2008). Sua presença parece ser um fator comum tanto no desenvolvimento da raiz, como início da formação da raiz lateral, de nódulos simbióticos, galhas e sincícios da raiz (MATHESIUS, 2003). Muitas mudanças que ocorrem quando o nematoide torna-se sedentário (como endoreduplicação, mitose sem citocinese e crescimento celular) podem ser parcialmente mimetizadas pela aplicação de AIA (ácido indol-3-acético), mostrando a importância desse hormônio na interação planta-nematoide (GHEYSEN e MITCHUM, 2008). Um elemento ARFAT encontrado no promotor UceS8.3 indica que ele também é regulado por auxina, e que esse elemento pode influenciar a expressão de *E2* em galhas (Figura 21).

Trabalhos anteriores mostraram que o gene *E2* (clone DB#103), pertencente à família *LeUBC4*, é abundantemente expresso em células gigantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) infectadas com *M. incognita* (BIRD, 1996; GHEYSEN e MITCHUM, 2008). Em plantas saudáveis, *LeUBC4* é expresso apenas em células meristemáticas, nas quais ele codifica uma proteína localizada no núcleo (BIRD, 1996). Um possível papel de *LeUBC4* foi proposto estar envolvido na proliferação nuclear (síntese de novo material cromossômico) e na regulação do ciclo celular (a proteína *LeUBC4* foi detectada no meio da fase G2 do ciclo). Neste mesmo trabalho, BIRD verificou uma forte expressão gênica codificando o fator de transcrição MYB, indicando que ele também é produzido na interação planta-nematoide. A forte expressão do gene *E2* em galha também pode estar relacionada com a presença de *cis*-elementos reconhecidos pelo fator de transcrição MYB.

O gene *CYP2* utilizado, inicialmente, como gene de referência nesse trabalho apresentou um aumento de 2,5, 1,5 e 5,5 vezes, respectivamente aos 14, 21 e 28 d.a.i, em relação ao controle, na primeira replicata biológica, e um aumento de quase o dobro após 21 d.a.i na segunda replicata biológica (Figura 20). Esses resultados sugerem o gene *CYP2* como um bom candidato para futuro isolamento do promotor e caracterização de elementos regulatórios responsáveis pelo padrão de expressão obtido.

No experimento de soja submetida ao ataque de *A. gemmatilis*, uma expressão de *E2* quatro vezes maior foi observada em folhas de soja após 30 minutos e uma hora de exposição

a lagartas da soja. Uma das repostas da planta à herbivoria é a elevada liberação de compostos voláteis, incluindo terpenos, etilenos e metil jasmonatos. Esses compostos atraem predadores para o local de alimentação do inseto e ativam eventos de sinalização envolvidos na resposta de defesa da planta. As plantas possuem a capacidade de ativar respostas de defesa a insetos ou a ferida mecânica por meio da ativação transcricional de genes de específicos. Essas respostas geralmente ocorrem entre poucos minutos a várias horas após o dano (WALLEY et al., 2007). Os genes induzidos por ferida, normalmente, tem a função de reparar o dano no tecido, produzir substâncias que inibam o crescimento do inseto predador (ex. inibidores de proteases) e ajustar o metabolismo da planta para as demandas nutricionais impostas.

O padrão de expressão de *E2* em resposta ao ataque de lagartas da soja pode ser relacionado à presença do elemento responsivo a Metil Jasmonato (MeJA), localizado entre +67 e +71 do promotor *UceS8.3*. Verificou-se esse *cis*-elemento no promotor da lipoxigenase 1 induzido por ferida e por metil jasmonato em grãos de cevada (ROUSTER et al., 1997). Trauma de ferida causado pela mastigação de insetos ou por ferida mecânica resulta em um rápido acúmulo (<30 min) de jasmonatos no local da ferida (HOWE e JANDER, 2008). Um possível papel da via ubiquitina-proteassoma na resposta à herbivoria e traumas de ferida seria na degradação de repressores ligados a fatores de transcrição que modulam a expressão de genes responsivos a jasmonatos. COI é uma E3 ubiquitina ligase (também chamada SCF<sup>COI</sup>) responsável por degradar proteínas JAZ com domínio ZIM durante a sinalização de jasmonatos. Essas proteínas JAZs atuam como repressores de genes responsivos a jasmonatos. Em condições normais, baixos níveis intracelulares de jasmonatos favorecem o acúmulo de proteínas JAZs que se ligam em fatores de transcrição (como MYC, um regulador positivo da transcrição), regulando negativamente a transcrição de genes responsivos a jasmonatos. Em resposta a lesão tecidual, como as causadas por insetos, um rápido acúmulo de jasmonato provoca a ubiquitinação mediada por SCF<sup>COI</sup> das proteínas JAZs resultando em desrepressão dos fatores de transcrição e expressão dos genes de resposta a ferida (HOWE e JANDER, 2008).

Jasmonatos (ácido jasmônico, JA, ou seu metil éster, MeJA) participam em vias de transdução de sinais associados a ferida mecânica, processos de senescência, abscisão foliar, inibição da germinação de sementes e na indução de tubérculos (LEMUS et al., 2000). MeJA também induz a expressão de proteínas relacionadas com a defesa, como o inibidor de proteinase PI-2 (FARMER e RYAN, 1992; XU et al., 1993), fenilalanina amônio liase

(GUNDLACH et al., 1992), chalcona sintase e proteínas ricas em prolina (CREELMAN et al., 1992).

### 5.3 – Análise *in silico* do padrão expressão do gene *E2* em soja

O padrão de expressão do gene *E2* (Glyma18g44850) analisado, utilizando-se os resultados presentes no banco GENOSOJA, demonstrou uma maior expressão desse gene, em folha (acessos resistentes PI230970 e PI561356), após 12, 24 e 48 horas após a infecção com o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Ferrugem asiática da soja), indicando um possível envolvimento desse gene nos mecanismo de resistência da planta. Uma maior expressão do gene *E2* também foi verificada em raízes de soja após a infecção por *B. japonicum* (bactéria fixadora de N<sub>2</sub> do solo) (Tabela 6). Esse aumento de expressão de *E2* em raízes infectadas por *B. japonicum* pode ser relacionado com a presença dos *cis*-elementos NODCON1GM (AAAGAT) e NODCON2GM (CTCTT) encontrados em promotores de nodulinas (genes tecido-específico de nódulos da raiz).

A expressão do gene *E2* verificada nas bibliotecas de estresse abiótico mostrou que esse gene também é ativado em raiz e folha após estresse hídrico. A ativação, em raiz, foi verificada após 75 até 150 minutos após o estresse; entretanto, o maior nível foi verificado entre 75 e 100 minutos. Em folhas, a maior ativação foi verificada entre 25 e 50 minutos após o estresse (Tabela 6). Essa ativação do gene *E2* em resposta a estresse abiótico pode ser relacionada com a presença dos *cis*-elementos MYB1AT (WAACCA) localizado em três regiões do promotor e MYCATRD22 (CACATG), localizados entre +155 e +159, responsáveis pelo reconhecimento dos fatores de transcrição MYB e MYC, respectivamente. Esses elementos estão envolvidos na sinalização de estresse hídrico ativado pelo hormônio ácido abscísico (ABA). Esse hormônio é produzido em condições de déficit hídrico e está envolvido na ativação de vários genes induzidos por seca.



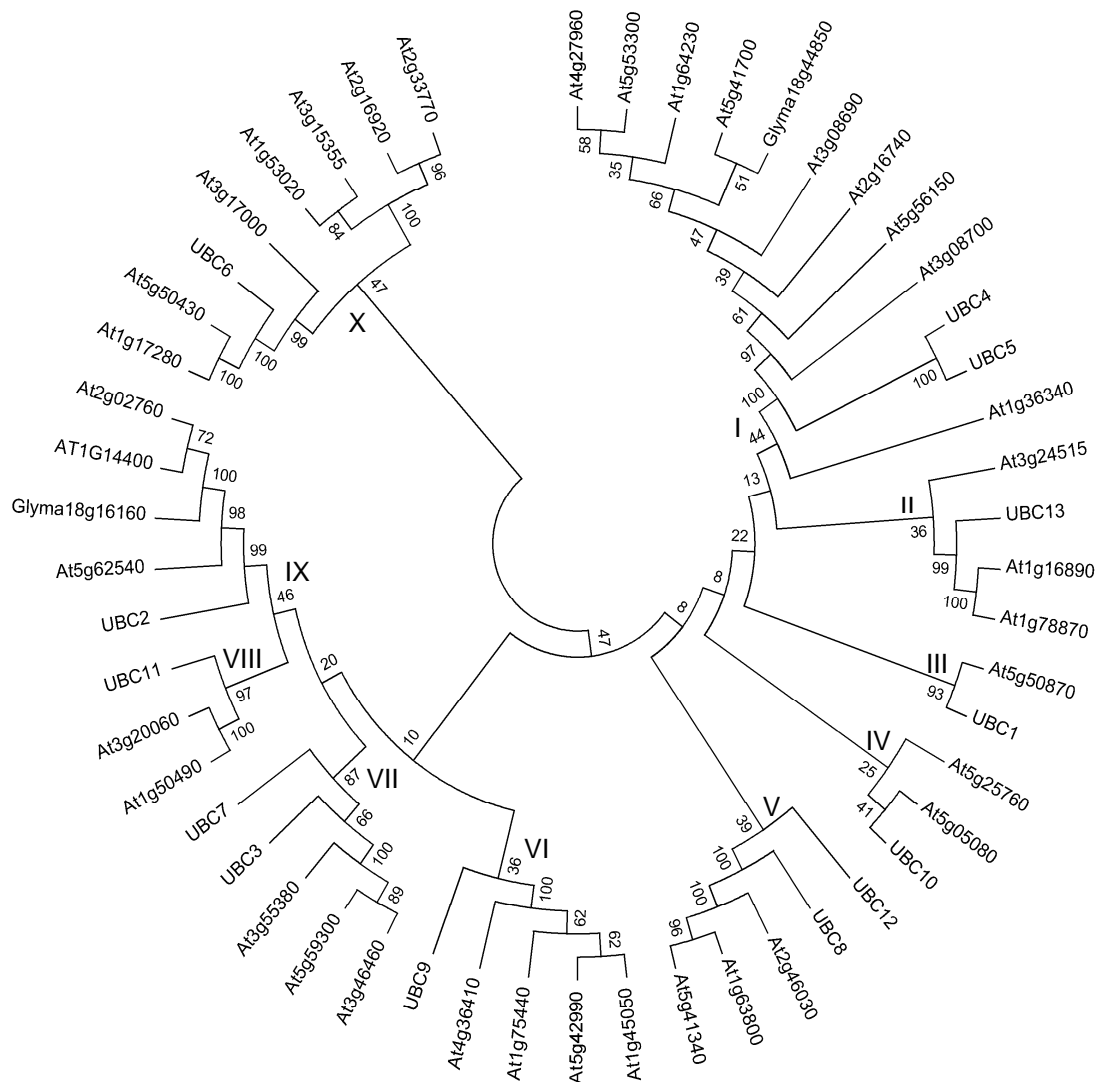
**Tabela 6.** Padrão de expressão de *E2* obtido a partir das bibliotecas subtrativas presentes no banco GENOSOJA

Cultivar	Tecido	Tratamento	Tempo de coleta	Número de reads de <i>E2</i>	RPKM*	Número total de reads
PI230970	Folhas	Ferrugem asiática da soja	1 e 6 horas após a infecção	5	22,12	4.679.963
PI230970	Folhas	Ferrugem asiática da soja	12 e 24 horas após a infecção	5062	19.204,50	4.878.530
PI230970	Folha	Ferrugem asiática da soja	48 e 72 horas após a infecção	625	2.021,40	4.355.862
PI561356	Folha	Ferrugem asiática da soja	12, 24 e 48 horas após a infecção	3328	9.898,06	5.185.015
PI561356	Folha	Ferrugem asiática da soja	72 e 96 horas após a infecção	0	295,43	5.000.616
MG/BR46 (conquista)	Raiz	<i>B. japonicum</i> / com N <sub>2</sub>	-	893	2.484,34	5.343.969
MG/BR46 (conquista)	Raiz	<i>B. japonicum</i> / sem N <sub>2</sub>	-	529	1.424,66	4.621.072
Embrapa 48	Raiz	Estresse de seca	25 – 50 minutos após o estresse	0	965,27	5.144.645
Embrapa 48	Raiz	Estresse de seca	75 – 100 minutos após o estresse	299	591,63	5.644.473
Embrapa 48	Raiz	Estresse de seca	125 – 150 minutos após o estresse	65	195,97	5.359.395
Embrapa 48	Folha	Estresse de seca	25 – 50 minutos após o estresse	938	6.728,50	3.095.694
Embrapa 48	Folha	Estresse de seca	75 – 100 minutos após o estresse	200	354,58	5.731.156
Embrapa 48	Folha	Estresse de seca	125 – 150 minutos	222	548,15	5.545.375

\*RPKM – Reads por kilobase de éxon por Milhão de reads mapeados

#### 5.4 – Análise filogenética de proteínas UBCs

A análise filogenética realizada nesse trabalho revelou que as proteínas E2 dos três organismos analisados (*S. cerevisiae*, *A. thaliana* e *Glycine Max*) podem ser divididas em 10 subgrupos (classificação baseada na classificação disponível no *Saccharomyces* Genome Database e na classificação feita por Kraft *et al.*, 2005) (Figura 23). A função de cada subgrupo foi relatada (baseada na função descrita para as subfamílias de levedura) e está descrita no ANEXO 3. De acordo com a análise filogenética, o gene *E2* (Glyma18g44850) pertence à subfamília UBC4/5, caracterizadas como proteínas envolvidas na degradação seletiva de proteínas anormais e de vida curta. O gene *E2* apresentou uma alta homologia com o gene *AtUBC8* (At5g41700), com 97% de identidade nos resíduos de aminoácidos. O gene *AtUBC8* foi relatado apresentar uma similaridade de 66% com o gene *ScUBC1*, 89% com *ScUBC5* e 91% com *ScUBC4* (GIROD *et al.*, 1993). Em leveduras os genes *ScUBC4* e *ScUBC5* codificam proteínas idênticas (92% de identidade) e ambos são induzidos por calor. Essa ativação se deve a presença de elementos de choque térmico presentes na região upstream desses genes. Leveduras mutantes, contendo os genes *ScUBC4* e *ScUBC5* deletados, quando expostas a temperaturas elevadas não formam colônias nas placas, indicando que esses genes são essenciais para a viabilidade celular em temperaturas elevadas (SEUFERT e JENTSCH, 1990).



**Figura 23. Análise filogenética dos membros da superfamília E2.** Glyma18g44850 – gene *E2* (controlado pelo promotor *UceS8.3*); Glyma18g16160 – gene *E2* utilizado como gene de referência nesse trabalho.

Genes pertencentes à subfamília UBC4 foram analisados quanto ao seu padrão de expressão em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento de *A. thaliana* (AtUBC8, 9, 10, 11, 12, 28, 29 e 30), por meio de experimentos de microarranjo de DNA (KRAFT et al., 2005; MA et al., 2005). Os genes AtUBC8 e 10 apresentaram um elevado nível de expressão em todos os órgãos, com uma maior expressão detectada em rosetas de folhas, raízes e pétalas (cerca de 6000 a 24000 vezes) (KRAFT et al., 2005). Os genes AtUBC9, 11, 28 e 29 também apresentaram níveis significativos de expressão em todos os órgãos examinadas, entretanto, AtUBC12 e 30 mostraram um padrão de expressão extremamente baixo em todos os órgãos (KRAFT et al., 2005). Esses genes também foram analisados quanto à resposta a estresse

(disponível no banco Genevestigator) e várias sequências codificadoras de E2 mostraram ser ativadas, pelo menos três vezes, em resposta a vários estímulos. Os genes AtUBC17, 20 e 31 mostraram ser induzidos por estresses bióticos e o gene AtUBC32 foi induzido por tratamentos com ácido abscísico e por estresse osmótico (KRAFT et al., 2005).

O terceiro grupo contendo UBC1 também foi relatado estar envolvido na degradação de proteínas anormais e de vida curta. Esses três subgrupos (UBC1, 4 e 5), além de ter homologia na sequência proteica, possuem funções análogas (entre *S. cerevisiae* e *A. thaliana*), demonstrando uma possível conservação de suas funções entre os organismos.

O gene *E2* utilizado nesse estudo, como gene referência (Glyma18g16160), está agrupado com os genes da subfamília UBC2 e pertence ao subgrupo IX. O gene *ScUBC2* (RAD6) foi um dos primeiros genes codificando para enzimas de conjugação a ubiquitina com função caracterizada em levedura. Esse gene foi relatado estar envolvido no processo de reparo do DNA e na ativação/repressão transcricional através da degradação proteínas cromossomais (ubiquitinação das histonas H2A e H2B) facilitando o acesso de enzimas ao DNA. Trabalhos anteriores demonstraram que o gene *GmUBC2* de soja, homólogo ao gene RAD6 de levedura, é induzido por estresse salino (2,5 vezes) e por seca (3 vezes) em soja. *GmUBC2* está localizado no núcleo e no citosol e a sua superexpressão em plantas de *A. thaliana* transformadas confere tolerância a sal e seca (ZHOU et al., 2010). Essa proteção está envolvida com a íon homeostase celular das plantas. Esses resultados sugerem um importante papel da via ubiquitina-proteassoma na resposta de estresse das plantas.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos, o presente trabalho traz novas e importantes informações, que representam avanços na caracterização do promotor UceS8.3, previamente isolado e patenteado, por meio da determinação do perfil de expressão do gene *E2* em nível transcricional.

A seleção de genes de referência é fundamental para uma correta normalização dos dados de PCR quantitativo. Dessa forma, inicialmente vários genes foram testados em relação a sua estabilidade de expressão, para cada experimento em questão. Os genes com expressão mais estável selecionados para a normalização em diferentes tecido de soja foram ELF1A, TUA5, CYP2 e UBC2. Os genes com expressão mais estável para os tratamentos de estresse biótico foram TUA5, ELF1A, G6PD e ELF1B, no caso de raízes infectadas com nematoide, e foram CYP2 e ELF1A, para folhas atacadas por lagarta-da-soja. Essa validação de genes de referência em soja, sob esses tratamentos, representa uma contribuição para aperfeiçoamento de futuras análises de expressão gênica nessa importante *commoditie* mundial.

Considerando o perfil de expressão em plantas de soja, foi possível observar que o gene *E2* é estávelmente expresso durante o estágio vegetativo (V4) e reprodutivo (R2), sendo mais abundante no final do ciclo da soja (R4), provavelmente devido a senescência da planta.

O perfil de expressão em raízes de soja inoculadas com o nematoide de galha *M. incognita* no primeiro experimento demonstrou que a quantidade de transcritos de *E2* aumenta de 6 a 7 vezes em 21 e 28 d.a.i. Apesar desse resultado não ter sido verificado no segundo experimento, esse dado é promissor e demanda nova repetição biológica de qPCR e localização histológica da expressão de *E2* em células gigantes, células vizinhas e células do parênquima por hibridização *in situ*.

Foi observado que os transcritos de *E2* são rapidamente acumulados de duas a quatro vezes após desfolha por lagarta-da-soja *A. gemmatalis*, em relação a folhas não tratadas.

A análise da seqüência do promotor UceS8.3, utilizando programas específicos e informações da literatura, demonstrou que esse promotor contém *cis*-elementos regulatórios que podem ser responsáveis pelo aumento da transcrição de *E2* detectado por qPCR no período de senescência, em raízes invadidas por nematoide e folhas atacadas por lagarta, além do acúmulo de transcritos de *E2* observado no banco GENOSOJA após invasão por fungo, nodulação com rizóbio e resposta rápida a estresse hídrico.

## 7. PERSPECTIVAS

Os próximos experimentos visam localizar a expressão do gene *E2* em raízes de soja inoculadas com *M. incognita* por meio de hibridização *in situ*. Nesse experimento, os cortes histológicos em diferentes tempos permitirão verificar o momento que ocorre o maior acúmulo de transcritos de *E2* e o tipo celular que apresenta esse acúmulo (parênquima vascular, córtex, células adjacentes ou células gigantes).

Também serão feitas construções gênicas contendo deleções do promotor UceS8.3 para a transformação genética de plantas modelo, visando buscar regiões tecido-específica de raiz (para o direcionamento de expressão gênica contra nematoides) e visando confirmar o padrão de expressão gênica induzido por estresse biótico e abiótico, relacionando com a presença do *cis-elemento* nos módulos do promotor utilizados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; SHINOZAKI, K. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell**, v. 9, n. 10, 1859-68, 1997.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, 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 Res**, v. 64, n. 15, 5245-50, 2004.

BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science**, v. 234, n. 4773, 179-86, 1986.

BAKSH, A.; RAO, A. Q.; SHAHID, A. A.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Camv 35S is a Developmental Promoter Being Temporal and Spatial in Expression Pattern of Insecticidal Genes (CryIac & Cry2a) in Cotton. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, 37-44, 2009.

BARROS, R. Doenças da Cultura da Soja. Tecnologia e Produção - Soja - 2007/2008. **Fundação MS**, n., 109-122, 2008.

BERTIOLI, D. J.; SMOKER, M.; BURROWS, P. R. Nematode-Responsive Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter and Its Subdomains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 3, 189-196, 1999.

BIRD, D. M. Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. **J Parasitol**, v. 82, n. 6, 881-8, 1996.

BIRD, D. M. Signaling between nematodes and plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 7, n. 4, 372-6, 2004.

BOURDON, V.; HARVEY, A.; LONSDALE, D. M. Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. **EMBO Rep**, v. 2, n. 5, 394-8, 2001.

BROWN, J. W. S.; SIMPSON, C. G. SPLICE SITE SELECTION IN PLANT PRE-mRNA SPLICING. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 1, 77-95, 1998.

BRUSKY, J.; ZHU, Y.; XIAO, W. UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet**, v. 37, n. 3, 168-74, 2000.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 2, 181-199, 1997.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; EARL, S.; HARRISON, E.; MATHAS, E.; NAVABPOUR, S.; PAGE, T.; PINK, D. The molecular analysis of leaf senescence-a genomics approach. **Plant Biotechnol J**, v. 1, n. 1, 3-22, 2003.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUTLER, J. E.; KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes Dev**, v. 16, n. 20, 2583-92, 2002.

BYBD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **J Nematol**, v. 15, n. 1, 142-3, 1983.

CAI, M.; WEI, J.; LI, X.; XU, C.; WANG, S. A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissue-specific gene expression in transgenic plants. **Plant Biotechnol J**, v. 5, n. 5, 664-74, 2007.

CALLIS, J.; FROMM, M.; WALBOT, V. Introns increase gene expression in cultured maize cells. **Genes Dev**, v. 1, n. 10, 1183-200, 1987.

CAMPOS, V. P. Manejo de doenças causadas por Fito nematoides. Lavras MG, FAEPE, 1999.

CASTEEL, C. L.; O'NEILL, B. F.; ZAVALA, J. A.; BILGIN, D. D.; BERENBAUM, M. R.; DELUCIA, E. H. Transcriptional profiling reveals elevated CO<sub>2</sub> and elevated O<sub>3</sub> alter resistance of soybean (*Glycine max*) to Japanese beetles (*Popillia japonica*). **Plant Cell Environ**, v. 31, n. 4, 419-34, 2008.

CHEN, X.; WANG, B.; WU, R. A gibberellin-stimulated ubiquitin-conjugating enzyme gene is involved in alpha-amylase gene expression in rice aleurone. **Plant Mol Biol**, v. 29, n. 4, 787-95, 1995.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Mol Biol**, v. 18, n. 4, 675-89, 1992.

CLANCY, M.; HANNAH, L. C. Splicing of the maize Sh1 first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing. **Plant Physiol**, v. 130, n. 2, 918-29, 2002.

CONKLING, M. A.; CHENG, C. L.; YAMAMOTO, Y. T.; GOODMAN, H. M. Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. **Plant Physiol**, v. 93, n. 3, 1203-11, 1990.

CREELMAN, R. A.; BELL, E.; MULLET, J. E. Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic Acid biosynthesis. **Plant Physiol**, v. 99, n. 3, 1258-60, 1992.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. Tecnologia e Produção - Soja - 2007/2008. **Fundação MS**, n., 91-124, 2008.

DESENBAHIA. Boletim anual do mercado de grãos: Soja. Safra 2008/2009 e Expectativas para 2009/2010. **Agencia de fomento do Estado da Bahia**, n., 2009.

DEVOTO, A.; MUSKETT, P. R.; SHIRASU, K. Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. **Curr Opin Plant Biol**, v. 6, n. 4, 307-11, 2003.

DIAZ-DE-LEON, F.; KLOTZ, K. L.; LAGRIMINI, L. M. Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. **Plant Physiol**, v. 101, n. 3, 1117-8, 1993.

DIECKHOFF, P.; BOLTE, M.; SANCAK, Y.; BRAUS, G. H.; IRNIGER, S. Smt3/SUMO and Ubc9 are required for efficient APC/C-mediated proteolysis in budding yeast. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 5, 1375-87, 2004.

DOHMEN, R. J.; MADURA, K.; BARTEL, B.; VARSHAVSKY, A. The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, 7351-5, 1991.

DREHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. **Ann Bot**, v. 99, n. 5, 787-822, 2007.

ELMAYAN, T.; TEPFER, M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. **Transgenic Res**, v. 4, n. 6, 388-96, 1995.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. **Sistema de produção: Embrapa Soja**, n. 1, 2004.

EULGEM, T.; RUSHTON, P. J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends Plant Sci**, v. 5, n. 5, 199-206, 2000.

EXPOSITO-RODRIGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PEREZ, A.; PEREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biol**, v. 8, n., 131, 2008.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. **Plant Cell**, v. 4, n. 2, 129-134, 1992.

FEHLBERG, V.; VIEWEG, M. F.; DOHMANN, E. M.; HOHNJEC, N.; PUHLER, A.; PERLICK, A. M.; KUSTER, H. The promoter of the leghaemoglobin gene Vflb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. **J Exp Bot**, v. 56, n. 413, 799-806, 2005.

FICKETT, J. W.; HATZIGEORGIOU, A. G. Eukaryotic promoter recognition. **Genome Res**, v. 7, n. 9, 861-78, 1997.

FOSU-NYARKO, J.; JONES, M. G.; WANG, Z. Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. **Mol Plant Pathol**, v. 10, n. 2, 237-48, 2009.



- GAME, J. C.; CHERNIKOVA, S. B. The role of RAD6 in recombinational repair, checkpoints and meiosis via histone modification. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, n. 4, 470-82, 2009.
- GEETHA, T.; JIANG, J.; WOOTEN, M. W. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. **Mol Cell**, v. 20, n. 2, 301-12, 2005.
- GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annu Rev Phytopathol**, v. 40, n., 191-219, 2002.
- GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. Molecular Insights in the Susceptible Plant Response to Nematode Infection. **Plant Cell Monogr**, n., 45-81, 2008.
- GILON, T.; CHOMSKY, O.; KULKA, R. G. Degradation signals recognized by the Ubc6p-Ubc7p ubiquitin-conjugating enzyme pair. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 19, 7214-9, 2000.
- GIROD, P. A.; CARPENTER, T. B.; VAN NOCKER, S.; SULLIVAN, M. L.; VIERSTRA, R. D. Homologs of the essential ubiquitin conjugating enzymes UBC1, 4, and 5 in yeast are encoded by a multigene family in Arabidopsis thaliana. **Plant J**, v. 3, n. 4, 545-52, 1993.
- GODDIJN, O. J.; LINDSEY, K.; VAN DER LEE, F. M.; KLAP, J. C.; SIJMONS, P. C. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs. **Plant J**, v. 4, n. 5, 863-73, 1993.
- GOEBL, M. G.; YOCHER, J.; JENTSCH, S.; MCGRATH, J. P.; VARSHAVSKY, A.; BYERS, B. The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. **Science**, v. 241, n. 4871, 1331-5, 1988.
- GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, 895-9, 2003.
- GOODALL, G. J.; FILIPOWICZ, W. The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. **Cell**, v. 58, n. 3, 473-83, 1989.
- GRACIET, E.; WELLMER, F. The plant N-end rule pathway: structure and functions. **Trends Plant Sci**, v. 15, n. 8, 447-53, 2010.
- GROSSI DE SA, M. F.; GUIMARÃES, L. M.; BATISTA, J. A. N.; VIANA, A. A.; FRAGOSO, R. D. R.; MATTAR DA, S. M. C. COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODIFYING GENE EXPRESSION USING THE PROMOTER OF UBIQUITIN CONJUGATING PROTEIN CODING GENE OF SOYBEAN PLANTS. **EMBRAPA**, 20100005539, 31, 2010.
- GRUNEWALD, W.; KARIMI, M.; WIECZOREK, K.; VAN DE CAPPELLE, E.; WISCHNITZKI, E.; GRUNDLER, F.; INZE, D.; BEECKMAN, T.; GHEYSEN, G. A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. **Plant Physiol**, v. 148, n. 1, 358-68, 2008.

GUENIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.; GUTIERREZ, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **J Exp Bot**, v. 60, n. 2, 487-93, 2009.

GUNDLACH, H.; MULLER, M. J.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 6, 2389-93, 1992.

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. **Plant Mol Biol**, v. 49, n. 3-4, 373-85, 2002.

HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **EMBO J**, v. 24, n. 19, 3353-9, 2005.

HATFIELD, P. M.; GOSINK, M. M.; CARPENTER, T. B.; VIERSTRA, R. D. The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in Arabidopsis thaliana. **Plant J**, v. 11, n. 2, 213-26, 1997.

HE, B.; MAGILL, C.; STARR, J. L. Laser Capture Microdissection and Real-Time PCR for Measuring mRNA in Giant Cells Induced by Meloidogyne javanica. **J Nematol**, v. 37, n. 3, 308-12, 2005.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v. 8, n. 2, R19, 2007.

HELLMANN, H.; ESTELLE, M. Plant Development: Regulation by Protein Degradation. **Science**, v. 297, n. 5582, 793-797, 2002.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; MARTINELLI, A. P.; BOUCHARD, R. A.; FINER, J. J. A soybean (Glycine max) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. **Plant Cell Rep**, v. 28, n. 5, 837-49, 2009.

HERSHKO, A. Ubiquitin-mediated protein degradation. **J Biol Chem**, v. 263, n. 30, 15237-40, 1988.

HICKE, L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. **Trends Cell Biol**, v. 9, n. 3, 107-12, 1999.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 1, 297-300, 1999.

HILLER, M. M.; FINGER, A.; SCHWEIGER, M.; WOLF, D. H. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. **Science**, v. 273, n. 5282, 1725-8, 1996.

HINDERHOFER, K.; ZENTGRAF, U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. **Planta**, v. 213, n. 3, 469-73, 2001.

HOCHHEIMER, A.; TJIAN, R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. **Genes Dev**, v. 17, n. 11, 1309-20, 2003.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annu Rev Genet**, v. 30, n., 405-39, 1996.

HOFMANN, R. M.; PICKART, C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. **Cell**, v. 96, n. 5, 645-53, 1999.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu Rev Plant Biol**, v. 59, n., 41-66, 2008.

HU, R.; FAN, C.; LI, H.; ZHANG, Q.; FU, Y. F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Mol Biol**, v. 10, n., 93, 2009.

HUI, D.; IQBAL, J.; LEHMANN, K.; GASE, K.; SALUZ, H. P.; BALDWIN, I. T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. **Plant Physiol**, v. 131, n. 4, 1877-93, 2003.

HWANG, W. W.; VENKATASUBRAHMANYAM, S.; IANCULESCU, A. G.; TONG, A.; BOONE, C.; MADHANI, H. D. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. **Mol Cell**, v. 11, n. 1, 261-6, 2003.

INOMOTO, M. M.; ASMUS, G. L.; SILVA, R. A. D. Importância e manejo dos nematoides da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja**, n. 14, 276-277, 2010.

ITZHAKI, H.; MAXSON, J. M.; WOODSON, W. R. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 19, 8925-9, 1994.

JADHAV, T.; WOOTEN, M. W. Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination. **J Proteomics Bioinform**, v. 2, n., 316, 2009.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2007. **ISAAA Brief**, n. 37, 2007.

JIAN, B.; LIU, B.; BI, Y.; HOU, W.; WU, C.; HAN, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Mol Biol**, v. 9, n., 59, 2008.

JOHNSON, C. S.; KOLEVSKI, B.; SMYTH, D. R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. **Plant Cell**, v. 14, n. 6, 1359-75, 2002.

KAMAUCHI, S.; WADAHAMA, H.; IWASAKI, K.; NAKAMOTO, Y.; NISHIZAWA, K.; ISHIMOTO, M.; KAWADA, T.; URADE, R. Molecular cloning and characterization of two

soybean protein disulfide isomerases as molecular chaperones for seed storage proteins. **FEBS J**, v. 275, n. 10, 2644-58, 2008.

KHADEEVA, N. V.; KOCHIEVA, E. Z.; TCHEREDNITCHENKO, M. Y.; YAKOVLEVA, E. Y.; SYDORUK, K. V.; BOGUSH, V. G.; DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A. Use of buckwheat seed protease inhibitor gene for improvement of tobacco and potato plant resistance to biotic stress. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 3, 260-7, 2009.

KLINK, V. P.; OVERALL, C. C.; ALKHAROUF, N. W.; MACDONALD, M. H.; MATTHEWS, B. F. Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Planta**, v. 226, n. 6, 1389-409, 2007.

KONCZ, C.; DE GREVE, H.; ANDRE, D.; DEBOECK, F.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. The opine synthase genes carried by Ti plasmids contain all signals necessary for expression in plants. **EMBO J**, v. 2, n. 9, 1597-603, 1983.

KRAFT, E.; STONE, S. L.; MA, L.; SU, N.; GAO, Y.; LAU, O. S.; DENG, X. W.; CALLIS, J. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v. 139, n. 4, 1597-611, 2005.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 2-3, 95-125, 2006.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Brief Bioinform**, v. 9, n. 4, 299-306, 2008.

KUREK, I.; AVIEZER, K.; EREL, N.; HERMAN, E.; BREIMAN, A. The wheat peptidyl prolyl cis-trans-isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated. **Plant Physiol**, v. 119, n. 2, 693-704, 1999.

KUS, B. M.; CALDON, C. E.; ANDORN-BROZA, R.; EDWARDS, A. M. Functional interaction of 13 yeast SCF complexes with a set of yeast E2 enzymes in vitro. **Proteins**, v. 54, n. 3, 455-67, 2004.

LE HIR, H.; NOTT, A.; MOORE, M. J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 4, 215-20, 2003.

LEMUS, E. E. P.; HINOJOSA, G. F.; CORTÉS, H. P.; MATSUMOTO, K.; BARRUETO, L. P. Introdução aos Hormônios Vegetais. Brasília, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

LI, W.; YE, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 15, 2397-406, 2008.

LIAKOPOULOS, D.; DOENGES, G.; MATUSCHEWSKI, K.; JENTSCH, S. A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. **EMBO J**, v. 17, n. 8, 2208-14, 1998.

LUEHRSEN, K. R.; WALBOT, V. Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. **Mol Gen Genet**, v. 225, n. 1, 81-93, 1991.

LUEHRSEN, K. R.; WALBOT, V. Addition of A- and U-rich sequence increases the splicing efficiency of a deleted form of a maize intron. **Plant Mol Biol**, v. 24, n. 3, 449-63, 1994.

MA, L.; SUN, N.; LIU, X.; JIAO, Y.; ZHAO, H.; DENG, X. W. Organ-specific expression of Arabidopsis genome during development. **Plant Physiol**, v. 138, n. 1, 80-91, 2005.

MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K. A.; DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A. The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. **Nat Genet**, v. 26, n. 4, 403-10, 2000.

MATHESIUS, U. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. **Plant and Soil**, n. 255, 105-119, 2003.

MCCARTER, J. Molecular Approaches Toward Resistance to Plant-Parasitic Nematodes. **Plant Cell Monographs**, v. 15/2009, n., 239-267, 2008.

MCELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, v. 2, n. 2, 163-71, 1990.

MICHELLE, C.; VOURC'H, P.; MIGNON, L.; ANDRES, C. R. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? **J Mol Evol**, v. 68, n. 6, 616-28, 2009.

MISSÃO, M. R. Soja, origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Revista de Ciências empresariais**, v. 3, n. 1, 7-15, 2006.

MOON, J.; PARRY, G.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. **Plant Cell**, v. 16, n. 12, 3181-95, 2004.

MOREL, J. B.; DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. **Cell Death Differ**, v. 4, n. 8, 671-83, 1997.

MUKHOPADHYAY, D.; RIEZMAN, H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. **Science**, v. 315, n. 5809, 201-5, 2007.

MURATANI, M.; TANSEY, W. P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 3, 192-201, 2003.

NICOT, N.; HAUSMAN, J. F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **J Exp Bot**, v. 56, n. 421, 2907-14, 2005.

NONTACHAIYAPOOM, S.; SCOTT, P. T.; MEN, A. E.; KINKEMA, M.; SCHENK, P. M.; GRESSHOFF, P. M. Promoters of orthologous Glycine max and Lotus japonicus nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 20, n. 7, 769-80, 2007.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, n. 6005, 810-2, 1985.

OPPERMAN, C. H.; TAYLOR, C. G.; CONKLING, M. A. Root-knot nematode--directed expression of a plant root--specific gene. **Science**, v. 263, n. 5144, 221-3, 1994.

PANTHEE, D.; YUAN, J.; WRIGHT, D.; MAROIS, J.; MAILHOT, D.; STEWART, N. Global Gene Expression Analysis in Soybean in Response to the Causal Agent of Asian Soybean Rust (Phakopsora pachyrhizi Sydow). **ASA-CSSA-SSSA/ International Meetings**, n., 2006.

PARAG, H. A.; DIMITROVSKY, D.; RABOY, B.; KULKA, R. G. Selective ubiquitination of calmodulin by UBC4 and a putative ubiquitin protein ligase (E3) from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 325, n. 3, 242-6, 1993.

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

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 Res**, v. 30, n. 9, 36, 2002.

RAMOS, P. C. A via proteolítica dependente de ubiquitina / proteossoma. Campus de Gambelas. **Sociedade Portuguesa de Química**, n., 57-63, 2002.

RAVID, T.; HOCHSTRASSER, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, 679-90, 2008.

REETZ, E. R.; SANTOS, C.; CORRÊA, S.; SILVEIRA, D. D.; CARVALHO, C. D.; RUDOLFO, R. Planeta Soja. **Anuário Brasileiro da Soja**, v. 1, n., 6 - 26, 2008.

REID, K. E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S. T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC Plant Biol**, v. 6, n., 27, 2006.

ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. E. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. **Plant J**, v. 28, n. 2, 123-33, 2001.

ROGERS, S.; WELLS, R.; RECHSTEINER, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. **Science**, v. 234, n. 4774, 364-8, 1986.

ROMBAUTS, S.; DEHAIS, P.; VAN MONTAGU, M.; ROUZE, P. PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 1, 295-6, 1999.

ROSE, A. B. Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in Arabidopsis. **RNA**, v. 8, n. 11, 1444-53, 2002.

ROUSTER, J.; LEAH, R.; MUNDY, J.; CAMERON-MILLS, V. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. **Plant J**, v. 11, n. 3, 513-23, 1997.

SAMADDER, P.; SIVAMANI, E.; LU, J.; LI, X.; QU, R. Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice rubi3 gene in transgenic rice cells. **Mol Genet Genomics**, v. 279, n. 4, 429-39, 2008.

SANDAL, N. N.; BOJSEN, K.; MARCKER, K. A. A small family of nodule specific genes from soybean. **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 4, 1507-19, 1987.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; ALL., E. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, 178-83, 2010.

SCHULE, T.; ROSE, M.; ENTIAN, K. D.; THUMM, M.; WOLF, D. H. Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6-bisphosphatase in yeast. **EMBO J**, v. 19, n. 10, 2161-7, 2000.

SEUFERT, W.; FUTCHER, B.; JENTSCH, S. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. **Nature**, v. 373, n. 6509, 78-81, 1995.

SEUFERT, W.; JENTSCH, S. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. **EMBO J**, v. 9, n. 2, 543-50, 1990.

SEUFERT, W.; JENTSCH, S. Yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in selective protein degradation are essential for cell viability. **Acta Biol Hung**, v. 42, n. 1-3, 27-37, 1991.

SEUFERT, W.; MCGRATH, J. P.; JENTSCH, S. UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. **EMBO J**, v. 9, n. 13, 4535-41, 1990.

SHIEH, H. L.; CHEN, Y.; BROWN, C. R.; CHIANG, H. L. Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role for UBC1 in vesicle biogenesis. **J Biol Chem**, v. 276, n. 13, 10398-406, 2001.

SHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. D. S. Metodologia de Criação de Insetos para Avaliação de Agentes Entomopatogênicos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n., 1-20, 2001.

SINGH, R. K.; KABBAJ, M. H.; PAIK, J.; GUNJAN, A. Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 8, 925-33, 2009.

SPENCE, J.; SADIS, S.; HAAS, A. L.; FINLEY, D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, 1265-73, 1995.

STEWART, C. N., JR.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROTT, W. A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. **Plant Physiol**, v. 112, n. 1, 121-9, 1996.

SUN, L.; CHEN, Z. J. The novel functions of ubiquitination in signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 2, 119-26, 2004.

SUNILKUMAR, G.; MOHR, L.; LOPATA-FINCH, E.; EMANI, C.; RATHORE, K. S. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. **Plant Mol Biol**, v. 50, n. 3, 463-74, 2002.

SUTOH, K.; YAMAUCHI, D. Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. **Plant J**, v. 34, n. 5, 635-45, 2003.

TAKAI, R.; MATSUDA, N.; NAKANO, A.; HASEGAWA, K.; AKIMOTO, C.; SHIBUYA, N.; MINAMI, E. EL5, a rice N-acetylchitooligosaccharide elicitor-responsive RING-H2 finger protein, is a ubiquitin ligase which functions in vitro in co-operation with an elicitor-responsive ubiquitin-conjugating enzyme, OsUBC5b. **Plant J**, v. 30, n. 4, 447-55, 2002.

TAPIA, G.; VERDUGO, I.; YANEZ, M.; AHUMADA, I.; THEODULOZ, C.; CORDERO, C.; POBLETE, F.; GONZALEZ, E.; RUIZ-LARA, S. Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC1.1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. **Plant Physiol**, v. 138, n. 4, 2075-86, 2005.

TERZAGHI, W. B.; CASHMORE, A. R. Light-Regulated Transcription. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, 445-474, 1995.

TONGAONKAR, P.; CHEN, L.; LAMBERTSON, D.; KO, B.; MADURA, K. Evidence for an interaction between ubiquitin-conjugating enzymes and the 26S proteasome. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 13, 4691-8, 2000.

TORRES, R. G.; RIBEIRO, N. R.; CARLOS; BOER, A.; FERNANDES, O.; FIGUEIREDO, A. G.; NETO, A. F. Manejo Integrado de nematoides em Sistema de Plantio Direto no Cerrado. **Boletim técnico Manejo de nematoides no SPD Cerrados**, n., 2008.

TOWNSLEY, F. M.; RUDERMAN, J. V. Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* UBC11 gene. **Yeast**, v. 14, n. 8, 747-57, 1998.

ULRICH, H. D.; JENTSCH, S. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. **EMBO J**, v. 19, n. 13, 3388-97, 2000.

USDA. Levantamento mundial de produção de soja. **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**, n., 2010.

VAN DER EYCKEN, W.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. **Plant J**, v. 9, n. 1, 45-54, 1996.



VAN POUCKE, K.; KARIMI, M.; GHEYSEN, G. Analysis of nematode-responsive promoters in sugar beet hairy roots. **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet**, v. 66, n. 2b, 591-8, 2001.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, RESEARCH0034, 2002.

WALLEY, J. W.; COUGHLAN, S.; HUDSON, M. E.; COVINGTON, M. F.; KASPI, R.; BANU, G.; HARMER, S. L.; DEHESH, K. Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel cis-element. **PLoS Genet**, v. 3, n. 10, 1800-12, 2007.

WANG, P.; WANG, G.; JI, J.; ZENG, F. T.; HUANG, B. C.; CAO, J.; WU, Y. [Studies of somatic embryogenesis and genetic transformation by *Agrobacterium*- mediated in soybean]. **Yi Chuan**, v. 26, n. 5, 695-700, 2004.

WIEBEL, F. F.; KUNAU, W. H. The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. **Nature**, v. 359, n. 6390, 73-6, 1992.

WOO, H. H.; BRIGHAM, L. A.; HAWES, M. C. Primary structure of the mRNA encoding a 16.5-kDa ubiquitin-conjugating enzyme of *Pisum sativum*. **Gene**, v. 148, n. 2, 369-70, 1994.

WOO, H. R.; CHUNG, K. M.; PARK, J. H.; OH, S. A.; AHN, T.; HONG, S. H.; JANG, S. K.; NAM, H. G. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 13, n. 8, 1779-90, 2001.

WU, C.; WASHIDA, H.; ONODERA, Y.; HARADA, K.; TAKAIWA, F. Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. **Plant J**, v. 23, n. 3, 415-21, 2000.

XU, D.; MCELROY, D.; THORNBURG, R. W.; WU, R. Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants. **Plant Mol Biol**, v. 22, n. 4, 573-88, 1993.

YAMAMOTO, Y. T.; TAYLOR, C. G.; ACEDO, G. N.; CHENG, C. L.; CONKLING, M. A. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. **Plant Cell**, v. 3, n. 4, 371-82, 1991.

YAMAMOTO, Y. Y.; ICHIDA, H.; MATSUI, M.; OBOKATA, J.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; ABE, T. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. **BMC Genomics**, v. 8, n., 67, 2007.

YIN, Z.; MENG, F.; SONG, H.; WANG, X.; XU, X.; YU, D. Expression quantitative trait loci analysis of two genes encoding rubisco activase in soybean. **Plant Physiol**, v. 152, n. 3, 1625-37, 2010.

YOO, S. Y.; BOMBLIES, K.; YOO, S. K.; YANG, J. W.; CHOI, M. S.; LEE, J. S.; WEIGEL, D.; AHN, J. H. The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant

transformation vector affects the expression of the transgene. **Planta**, v. 221, n. 4, 523-30, 2005.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **J Comput Biol**, v. 12, n. 8, 1047-64, 2005.

ZHOU, G. A.; CHANG, R. Z.; QIU, L. J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in Arabidopsis. **Plant Mol Biol**, v. 72, n. 4-5, 357-67, 2010.

## 9 – ANEXOS

**ANEXO 1 – Média dos valores de *Ct* (*Ciclo threshold*) das duas replicatas biológicas juntas mais o desvio padrão para cada tecido e para cada gene estudado gerado pelo programa *Miner*.**

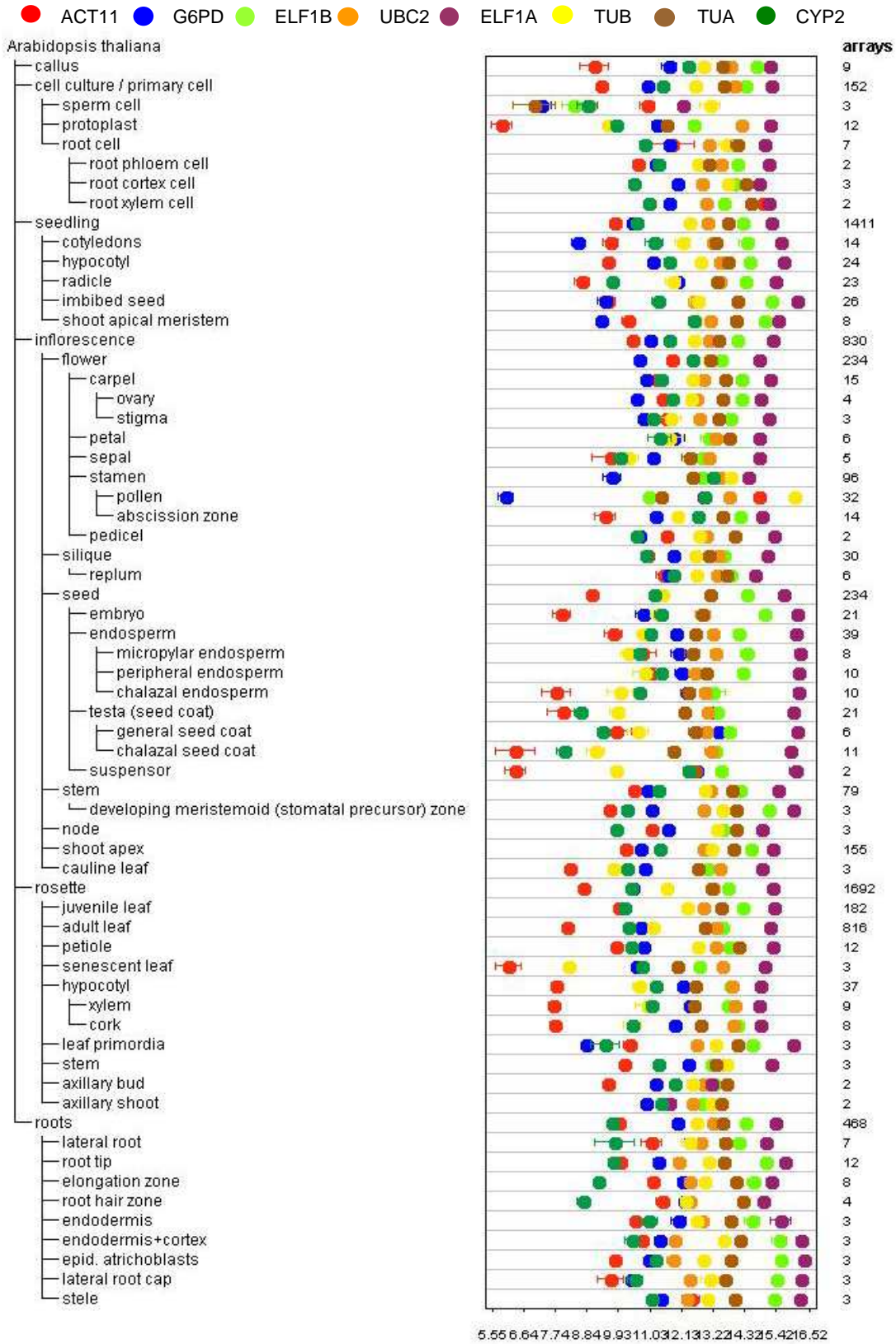
<b>Tempo V4</b>	CYP2	ELF1A	TUA5	ELF1B	ACT11
<b><i>Ct</i> ± DP</b>					
Folha	19.39 ± 0.631	20.30 ± 0.348	20.27 ± 0.498	24.58 ± 0.368	22.34 ± 0.165
Caule	19.066 ± 0.659	19.76 ± 0.649	19.9 ± 0.091	22.63 ± 0.347	20.3 ± 0.846
Raiz	20.985 ± 1.554	22.51 ± 2.624	22.61 ± 2.466	23.60 ± 1.158	23.61 ± 0.846
<b>Tempo R2</b>					
Folha	20.610 ± 0.344	20.61 ± 0.696	21.42 ± 1.063	24.96 ± 0.704	22.78 ± 0.433
Caule	20.152 ± 0.079	20.01 ± 0.267	19.71 ± 0.665	22.81 ± 0.765	20.73 ± 0.342
Raiz	23.260 ± 0.839	24.29 ± 1.470	25.27 ± 1.393	26.17 ± 1.842	24.83 ± 1.794
Flor	18.824 ± 0.285	18.92 ± 0.499	21.03 ± 2.854	22.61 ± 0.419	20.28 ± 0.224
<b>Tempo R4</b>					
Folha	20.464 ± 0.149	21.12 ± 0.311	21.63 ± 0.346	24.65 ± 0.453	22.42 ± 0.370
Caule	20.107 ± 0.721	20.76 ± 0.859	21.68 ± 1.097	22.82 ± 0.378	22.02 ± 0.386
Raiz	22.300 ± 0.375	23.13 ± 0.978	24.44 ± 1.745	24.16 ± 0.289	23.31 ± 1.303
Vagem	19.875 ± 0.443	19.56 ± 0.697	20.82 ± 0.422	23.02 ± 0.468	21.13 ± 0.964
<b>Eficiência ± DP / CV%</b>	0.949 ± 0.031 / 6.338	1.157 ± 0.038 / 10.469	1.148 ± 0.028 / 9.202	1.034 ± 0.049 / 9.364	1.118 ± 0.037 / 10.61
<b>Tempo V4</b>					
	UBC2	TUB	G6PD	E2	RB7
<b><i>Ct</i> ± DP</b>					
Folha	23.78 ± 0.619	24.77 ± 0.494	26.19 ± 0.743	23.06 ± 1.032	20.51 ± 2.140
Caule	22.33 ± 1.595	21.71 ± 0.399	21.95 ± 0.510	22.53 ± 0.286	19.15 ± 1.291
Raiz	25.65 ± 1.673	27.1 ± 4.981	23.26 ± 1.919	24.64 ± 1.609	19.79 ± 2.720
<b>Tempo R2</b>					
Folha	23.99 ± 0.333	28.56 ± 2.348	24.92 ± 0.294	23.78 ± 0.388	24.70 ± 0.686
Caule	23.58 ± 0.710	23.62 ± 3.643	21.99 ± 0.366	23.33 ± 0.232	20.36 ± 0.999
Raiz	27.015 ± 0.820	28.9 ± 1.285	25.87 ± 2.438	26.48 ± 1.058	22.013 ± 1.424
Flor	23.24 ± 0.717	21.9 ± 0.69	22.49 ± 0.675	23.49 ± 3.000	24.06 ± 1.000
<b>Tempo R4</b>					
Folha	24.04 ± 0.357	27.42 ± 0.488	25.52 ± 0.618	23.06 ± 0.237	24.76 ± 1.122
Caule	23.7 ± 0.831	27.89 ± 3.428	22.16 ± 0.434	22.31 ± 0.416	22.25 ± 0.228
Raiz	25.03 ± 0.121	27.9 ± 1.893	23.09 ± 0.554	24.24 ± 0.769	21.47 ± 1.589
Vagem	24.63 ± 0.500	23.44 ± 1.789	24.07 ± 0.806	25.32 ± 4.053	22.94 ± 1.875
<b>Eficiência ± DP / CV%</b>	1.076 ± 0.045 / 8.360	1.031 ± 0.032 / 14.575	1.107 ± 0.033 / 11.655	1.091 ± 0.036 / 10.613	0.976 ± 0.053 / 13.537

<b>Controle</b>	CYP2	ELF1A	TUA5	ELF1B	ACT11
<b><i>Ct ± DP</i></b>					
Raiz ( 7 d.a.i)	23.92 ± 1.981	23.92 ± 1.252	24.85 ± 1.139	25.07 ± 0.313	23.67 ± 1.581
Raiz ( 14 d.a.i)	23.57 ± 1.194	24.62 ± 0.890	24.68 ± 0.660	25.83 ± 1.837	25.35 ± 2.908
Raiz ( 21 d.a.i)	23.14 ± 1.348	23.97 ± 0.876	24.95 ± 1.049	25.86 ± 1.316	24.39 ± 1.922
Raiz ( 28 d.a.i)	23.85 ± 0.971	24.27 ± 0.727	25.01 ± 0.701	25.25 ± 0.783	24.3 ± 1.609
<b>Tratamento</b>					
Raiz ( 7 d.a.i)	24.03 ± 1.836	23.92 ± 0.614	24.73 ± 0.575	25.1 ± 1.847	25.1 ± 3.235
Raiz ( 14 d.a.i)	22.38 ± 1.202	23.21 ± 0.823	23.78 ± 0.917	25.98 ± 3.283	23.76 ± 0.910
Raiz ( 21 d.a.i)	21.29 ± 0.450	22.4 ± 0.706	23.7 ± 0.399	23.78 ± 0.520	23.22 ± 0.930
Raiz ( 28 d.a.i)	21.82 ± 0.346	24.34 ± 1.787	24.52 ± 1.102	24.31 ± 0.581	23.88 ± 1.333
<b>Eficiencia ± DP / CV%</b>	1.016 ± 0.018 / 12.376	0.892 ± 0.034 / 12.079	0.885 ± 0.025 / 16.414	0.816 ± 0.029 / 15.230	0.965 ± 0.030 / 16.890

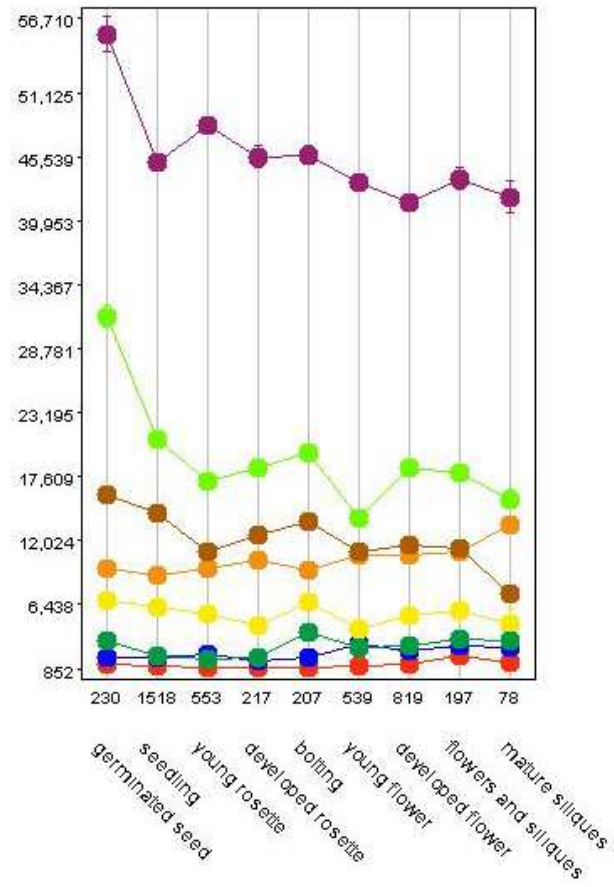
<b>Controle</b>	UBC2	TUB	G6PD	E2	RB7
<b><i>Ct ± DP</i></b>					
Raiz ( 7 d.a.i)	25.780	28.28 ± 1.536	23.030	26.9 ± 3.369	21.13 ± 0.486
Raiz ( 14 d.a.i)	23.660	29.46 ± 0.577	23.150	25.86 ± 2.162	21.54 ± 1.962
Raiz ( 21 d.a.i)	25.140	28.05 ± 1.009	22.850	26.53 ± 3.300	22.32 ± 5.245
Raiz ( 28 d.a.i)	25.920	29.03 ± 0.757	24.900	25.25 ± 1.678	20.87 ± 0.342
<b>Tratamento</b>					
Raiz ( 7 d.a.i)	24.340	28.21 ± 1.349	22.14 ±	26.24 ± 4.309	24.7 ± 7.865
Raiz ( 14 d.a.i)	25.860	27.95 ± 1.540	23.13 ±	24.33 ± 1.460	19.88 ± 0.719
Raiz ( 21 d.a.i)	25.390	27.04 ± 0.730	23.21 ±	23.19 ± 0.464	18.82 ± 5.614
Raiz ( 28 d.a.i)	26.030	28.6 ± 1.419	23.87 ±	24.14 ± 1.271	20.54 ± 1.713
<b>Eficiencia ± DP / CV%</b>	1.04 ± 0.03 / 11.56	0.897 ± 0.024 / 13.170	0.940 ± 0.031 / 21.42	0.870 ± 0.033 / 13.733	0.78 ± 0.029 / 16.962

	CYP2	ELF1A	TUA5	ELF1B	ACT11
<b><i>Ct ± DP</i></b>					
Folha ( 0h) controle	20.02 ± 0.148	21.57 ± 0.611	24.61 ± 1.526	25.17 ± 0.690	22.69 ± 1.531
Folha ( 15 min)	20.06 ± 0.363	21.60 ± 0.357	24.16 ± 0.453	25.33 ± 0.517	22.07 ± 0.450
Folha ( 30 min)	21.02 ± 0.188	22.46 ± 0.386	24.10 ± 1.239	26.02 ± 0.606	22.44 ± 0.775
Folha ( 1 h)	20.62 ± 0.152	22.16 ± 0.247	24.31 ± 0.711	25.34 ± 0.490	22.35 ± 0.066
Folha ( 3 h)	20.86 ± 0.423	22.27 ± 0.316	24.95 ± 0.238	25.75 ± 0.488	22.78 ± 0.127
<b>Eficiencia ± DP / CV%</b>	1.156 ± 0.018 / 9.25	1.128 ± 0.024 / 8.74	1.051 ± 0.028 / 12.327	0.972 ± 0.025 / 11.31	1.088 ± 0.028 / 12.96
	UBC2	TUB	G6PD	E2	
<b><i>Ct ± DP</i></b>					
Folha ( 0h) controle	24.64 ± 0.191	27.89 ± 0.124	24.54 ± 1.632	23.18 ± 1.484	
Folha ( 15 min)	24.18 ± 0.68	26.81 ± 0.593	25.11 ± 1.151	22.81 ± 0.658	
Folha ( 30 min)	24.63 ± 0.203	28.14 ± 0.551	26.01 ± 1.125	22.95 ± 1.334	
Folha ( 1 h)	24.65 ± 0.212	27.91 ± 0.455	25.59 ± 1.067	23.25 ± 1.535	
Folha ( 3 h)	24.99 ± 0.309	28.53 ± 1.034	25.45 ± 1.248	23.92 ± 1.256	
<b>Eficiencia ± DP / CV%</b>	1.075 ± 0.028 / 12.27	1.027 ± 0.020 / 11.58	1.032 ± 0.025 / 12.675	0.943 ± 0.027 / 15.41	

**ANEXO 2 – Perfil de expressão dos genes de referência obtido a partir dos dados de microarranjo disponíveis na plataforma Geninvestigator.**

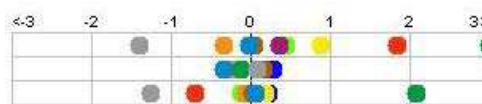


● ACT11 ● G6PD ● ELF1B ● UBC2 ● ELF1A ● TUB ● TUA ● CYP2



● ACT11 ● G6PD ● ELF1B ● UBC2 ● ELF1A ● TUB ● TUA ● CYP2 ● E2 ● RB7

Arabidopsis thaliana (experimental)  
 — H. schachtii  
 — M. incognita (early)  
 — M. incognita (late)



Arabidopsis thaliana (control)  
 — non-infected root samples  
 — non-infected root samples (early)  
 — non-infected root samples (late)

### ANEXO 3 - Classificação dos subgrupos de E2, nomenclatura e função

Número do grupo	Locus no genoma	Nome	Função	Referências
I	AT4G27960 AT5G53300 AT1G64230 AT5G41700 Glyma18g44850 AT3G08690 AT2G16740 AT5G56150 AT3G08700 YBR082C YDR059C AT1G36340	AtUBC9 AtUBC10 AtUBC28 AtUBC8 GmUBC4 AtUBC11 AtUBC29 AtUBC30 AtUBC12 ScUBC4 ScUBC5 AtUBC31	Medeia a degradação de proteínas anormais, de vida curta e em excesso, incluindo calmodulina e histonas e interage com muitas proteínas SCF ubiquitinas ligases, componentes da resposta ao estresse celular. Proteínas essenciais para o crescimento e viabilidade celular, além de ter um papel central na resposta ao estresse celular. Expressão induzida por calor.	(PARAG et al., 1993; SEUFERT e JENTSCH, 1990, 1991) (HOCHSTRASSER, 1996; KUS et al., 2004; SINGH et al., 2009) (TONGAONKAR et al., 2000)
II	AT3G24515 YDR092W AT1G16890 AT1G78870	AtUBC37 ScUBC13 AtUBC36 AtUBC35	Proteínas envolvidas na via de reparo pós-replicação do DNA, interage com Mms2p e monta cadeias de ubiquitinas ligadas pela Lys 63. Nível de expressão induzido em resposta a danos no DNA.	(BRUSKY et al., 2000; ULRICH e JENTSCH, 2000)
III	AT5G50870 YDR177W	AtUBC27 ScUBC1	Medeia a degradação seletiva de proteínas anormais e de vida curta, desempenham um papel na biogênese de vesículas e degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (ERAD), componente da resposta a estresse celular.	(SEUFERT e JENTSCH, 1991; SEUFERT et al., 1990) (SHIEH et al., 2001)
IV	AT5G25760 AT5G05080 YGR133W	AtUBC21 AtUBC22 ScUBC10	Envolvida na biogênese dos peroxissomos.	(WIEBEL e KUNAU, 1992)
V	YLR306W YEL012W AT2G46030 AT1G63800 AT5G41340	ScUBC12 ScUBC8 AtUBC6 AtUBC5 AtUBC4	Envolvidas na conjugação com RUB1 e na degradação catabólica da enzima Frutose 1,6 bifosfatase (FBPase).	(LIAKOPOULOS et al., 1998; SCHULE et al., 2000)
VI	AT1G45050 AT5G42990 AT1G75440 AT4G36410 YDL064W	AtUBC15 AtUBC18 AtUBC16 AtUBC17 ScUBC9	Envolvidas na conjugação com SUMO e na proteólise mediada pelo complexo promotor da anáfase (APC), controlando o ciclo celular.	(DIECKHOFF et al., 2004; SEUFERT et al., 1995)
VII	AT3G46460 AT5G59300 AT3G55380 YDR054C YMR022W	AtUBC13 AtUBC7 AtUBC14 ScUBC3 ScUBC7	Medeia a degradação de substratos chaves para a progressão do ciclo celular interagido com a Ubiquitina ligase (SCF). UBCs envolvidas na degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático ERAD).	(GOEBL et al., 1988; HILLER et al., 1996)



### Classificação dos subgrupos de E2, nomenclatura e função - Continuação

VIII	AT1G50490 AT3G20060 YOR339C	AtUBC20 AtUBC19 ScUBC11	ScUBC11 é similar a E2-C de <i>Xenopus</i> , proteína envolvida da degradação de ciclinas mitóticas e de proteínas que mantêm a coesão das cromátides irmãs durante o ciclo celular	(TOWNSLEY e RUDERMAN, 1998)
IX	YGL058W AT5G62540 Glyma18g16160 AT1G14400 AT2G02760	ScUBC2 AtUBC3 GmUBC2 AtUBC1 AtUBC2	Envolvida no reparo de DNA, ativação e repressão transcricional, esporulação e na via N-end rule	(DOHMEN et al., 1991; GAME e CHERNIKOVA, 2009) (HWANG et al., 2003)
X	AT1G17280 AT5G50430 YER100W AT3G17000 AT1G53020 AT3G15355 AT2G16920 AT2G33770	AtUBC34 AtUBC33 ScUBC6 AtUBC32 AtUBC26 AtUBC25 AtUBC23 AtUBC24	Envolvida na degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático (ERAD).	(GILON et al., 2000)

**ANEXO 4 – RT-PCR de diferentes partes da raiz de soja inoculada/ não inoculada com nematoide.** (A) 7 d.a.i – planta controle coletada em duas regiões da raiz: meio (7MN) e ponta (7PN); planta infectada coletada em duas regiões da raiz: meio (7MI) e ponta (7PI). (B) 14 d.a.i – planta controle coletada em duas regiões da raiz: meio (14MN) e ponta (14PN); planta infectada coletada em duas regiões da raiz: ponta (14PI) e galha (14GI). (C) 21 d.a.i – planta controle coletada em duas regiões da raiz: meio (21MN) e ponta (21PN); planta infectada coletada somente na galha (21GI). (D) 28 d.a.i – 21 d.a.i – planta controle coletada em duas regiões da raiz: meio (28MN) e ponta (28PN); planta infectada coletada somente na galha (28GI).

