

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Estruturação genômica e padrão de expressão das Proteínas
Híbridas Ricas em Prolina (HyPRPs) em soja [*Glycine max* (L.)
Merrill]**

Rafael Rodrigues de Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientação: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia
Co-orientação: Prof. Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini**

Porto Alegre, março de 2010

INSTITUIÇÃO DE EXECUÇÃO E FONTE FINANCIADORA

INSTITUIÇÃO DE EXECUÇÃO E FONTE FINANCIADORA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) como parte do projeto GENOSOJA e com financiamento da União Européia como parte do projeto BIOTECSUR - UE 127119.

**“Há quem passe pelo bosque e só veja lenha para fogueira.”
Liev Nikoláievich Tolstói**

Dedico este trabalho a Décio, Neusa, Bruno e Matheus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente meus pais, meus irmãos e meus avós, que mantiveram seu amor incondicional sempre presente.

Agradeço à minha orientadora, a professora Luciane Passaglia, pelos sete anos de orientação, pela paciência, constante disposição, amizade e ensinamentos durante esse tempo.

Agradeço a minha co-orientadora, Dr^a. Maria Helena Zanettini, pelos incentivos e pelo exemplo de primazia pela qualidade.

Agradeço à profa. Márcia Margis por todos incentivos, amizade e grandes ensinamentos para além da ciência.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Genética Vegetal: Roberto Farina, René Soares, Júlio Lima, Marcelo Pedron, João Abreu, Rafael Rauber, Rafael Agrizani, Diego Reartes, Bárbara Barzan, Adriana Giongo, Samanta Campos, Anelize Beneduzi, Carolina Ribeiro, Fernanda Lazzarotto, Andréia Caverzan, Gisele Passaia, Beatriz Strohm, Marta Bencke, Camila Zanela, Gecele Pagi, Márcia Goetze, Mirian Buton e demais meninas, pelo ótimo convívio profissional e pessoal.

Agradeço ao Lauro Bucker, Rafael Arenhart e ao Alexandro Cagliari, pelo apoio e auxílios, sem os quais esta dissertação não existiria.

Agradeço ao tio Miguel por me mostrar que sempre existe “o fato alternativo às interpretações”.

Agradeço ao Gilberto Rodrigues pelo acolhimento no início da graduação.

Agradeço ao Tabajara, Cleuza e Aimée pelas inspirações filosóficas e literárias.

Agradeço ao Pablo e a Toninha pela amizade.

Agradeço a “*mi otra mitad*”, Jórgia Carbonera, por ter me mostrado que o amor realmente pode ser lindo.

Agradeço a todos os meus amigos de infância Thiago Casanova, William Carvalho, Rafael Carvalho, Fabio Silva e Leonardo Figueredo, aos amigos da Biologia André Barbosa, Manoel Rodrigues, Rodrigo Leonel, Marcos Braga, Bruno Cemin, Josielma Hofman e a outros que a vida trouxe, componentes chave da minha constituição humana.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS pelas excelentes condições de trabalho e inúmeros exemplos profissionais.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
OBJETIVO GERAL.....	31
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	32
CAPÍTULO I - Identificação, posicionamento e filogenia das HyPRPs em soja e o padrão de expressão de três dos seus membros.....	33
CAPÍTULO II - Transformação da Soja.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Capítulos I e II).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

8CM - domínio com oito resíduos de cisteína conservados

aa - aminoácido

ABA - ácido abscísico

AS - ácido salicílico

°C - graus Celsius

cDNA - DNA complementar

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleosídeos trifosfatados = desoxirribonucleotídeos

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

eF - *elongation Factor* (fator de alongamento)

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EST - *expressed sequence tags* (sequências-marcas de genes expressos)

GFP - proteína de fluorescência verde

h - hora(s)

HPT - higromicina fosfotransferase, gene de resistência à higromicina

L - litro

LB - meio de cultura Luria Broth

M - molar

mg - miligrama

Mg²⁺ - íon de magnésio

mL - mililitro(s)

mM - milimolar

mg L⁻¹ - miligramas por litro

mRNA - RNA mensageiro

MS - meio de cultura de tecidos vegetais de Murashige e Skoog

nt - nucleotídeo(s)

pb - par(es) de bases

PCR - reação em cadeia da DNA polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PI - acesso resistente

poli-T - oligonucleotídeo de desoxitimidina

PRD - domínio rico em prolinas
q-PCR - PCR quantitativa em tempo real
RNA - ácido ribonucleico
RNAi - RNA de interferência
rpm - rotação(ões) por minuto
RT - transcriptase reversa
SDS - dodecil sulfato de sódio
SP - peptideo sinal direcionador à parede celular
 μg - micrograma
 μL - microlitro(s)
 μM - micromolar
V - volume

RESUMO

Os estresses abióticos, tais como seca, alta salinidade e temperaturas extremas são as causas primárias de quebras de safra na agricultura mundial, reduzindo a produção das principais culturas em mais de 50%. Dentre os estresses citados, a seca é um dos principais responsáveis pelas perdas na produção, mesmo que as plantas, ao longo da evolução, já tenham desenvolvido complexas vias metabólicas de resistência à falta de água. As funções classicamente conhecidas da parede celular são: estruturação da planta, determinação do tamanho e do formato das células vegetais e atuação como barreira mecânica à invasão de patógenos. Além disso, vários genes que codificam proteínas da parede celular têm sua regulação alterada mediante alta salinidade, seca e baixas temperaturas, indicando sua participação na resposta ao estresse hídrico. As Proteínas Híbridas Ricas em Prolina (HyPRPs) são glicoproteínas de parede celular com função pouco conhecida. O gene *SbPRP* (*Glyma14g14220*), membro da família *HyPRP* de soja, teve sua expressão aumentada perante a seca, ao estresse salino, a hormônios vegetais, ao ácido salicílico e a infecções virais em um trabalho onde foi utilizada a técnica de Northern blot.

Com o objetivo de entender a atuação da proteína *SbPRP* na aclimatação da soja para tolerância à seca, a região codificadora do gene *SbPRP* foi isolada por PCR a partir do DNA total de *Glycine max* (cultivar IAS5), utilizando-se iniciadores específicos. Através do sistema Gateway-Invitrogen de clonagem por recombinação foram obtidas construções para superexpressão e silenciamento de *SbPRP*. Conjuntos embriogênicos somáticos das cultivares IAS5 e Vencedora foram submetidos ao protocolo de transformação, que combina bombardeamento com o sistema *Agrobacterium* e ao protocolo de biolística. Atualmente, embriões histodiferenciados encontram-se na fase de regeneração, já tendo sido obtidas cinco plântulas trifolioladas relativas à construção de superexpressão.

Com o sequenciamento do genoma da soja foi possível a identificação de 35 genes *HyPRP*. Através de análises filogenéticas, envolvendo os 35 membros *HyPRP* de soja, o gene *SbPRP* (*Glyma14g14220*) ficou agrupado no mesmo clado composto por outros três genes *HyPRP* (*Glyma04g06970*, *Glyma06g07070* e *Glyma17g32100*). Na tentativa de aumentar o conhecimento do papel biológico das HyPRPs em soja, foram delineados experimentos para verificação da resposta dos quatro genes do clado monofilético (*Glyma04g06970*, *Glyma06g07070*, *Glyma17g32100* e *Glyma14g14220*). Transcritos do gene *Glyma06g07070* não puderam ser detectados, sendo excluídos das

análises. Foi possível avaliar os transcritos de três destes genes por PCR em Tempo Real, a partir de RNA de plantas de soja submetidas a tratamentos de alta salinidade, ácido abscísico (ABA), ácido salicílico e infecção por *Phakopsora pachirizi* (fungo causador da ferrugem asiática). Foram constatados aumentos significativos na expressão dos genes em diversos tempos após a inoculação de uredinósporos de *P. pachirizi*, em resposta a tratamento com ABA e em resposta ao ácido salicílico. O tratamento com sal reprimiu a expressão dos genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100*. Os resultados obtidos reforçam a possibilidade das HyPRPs estarem envolvidas em resposta a estresses bióticos e abióticos.

ABSTRACT

Abiotic stresses like drought, high salinity and high temperatures are the main causes of yield losses in agriculture, causing production decreases of more than 50% in the major crops around the world. Among the cited stresses, drought figures as one of the most important agents causing production decrease, even though plants have developed complex metabolic pathways to tolerate water deficit along evolution. The traditional cell wall functions known are: plant structure, cell format and size determination, and a role as mechanical barrier against pathogen attacks. Besides that, many genes encoding cell wall proteins have their regulation modified by high salinity, drought and low temperatures, which indicates a participation in response to water stress. The Hybrid Proline Rich Proteins (HyPRPs) are cell wall glycoproteins with poorly known function. The gene *SbPRP* (*Glyma14g14220*), a *HyPRP* soybean member, has its expression increased under drought conditions, high salinity, treatment with hormones, salicylic acid and viral infections.

Aiming to understand the role of the SpPRP protein in the soybean drought tolerance acclimatation, the *SbPRP* gene coding sequence was isolated by PCR cloning using specific primers and *Glycine max* (cultivar IAS5) genomic DNA as template. Constructions were obtained through the Gateway system for *SbPRP* super expression and silencing. Somatic embryogenic (IAS5 and Vencedora soybean cultivars) sets were submitted to the combined *Agrobacterium*/bombardment or biolistic protocols. Histo-differentiated embryos are presently in the regeneration phase, and five tree-leaf-seedlings containing the super expression construction were already obtained.

After the soybean genome sequencing, it was possible to identify 35 *HyPRP* genes. Based on phylogenetic analysis, the *SbPRP* gene has grouped in the same clade formed by three other *HyPRP* genes (*Glyma04g06970*, *Glyma06g07070* and *Glyma17g32100*). Trying to increase the knowledge about a possible biological role of the soybean HyPRPs, experiments were delineated to check the response of the four monophyletic clade forming genes (*Glyma04g06970*, *Glyma17g32100* and *Glyma14g14220*). Transcripts of three genes were detected and analyzed with Real Time PCR experiments after high salinity, ABA, and salicylic acid treatments, and *Phakopsora pachirizi* infection (Asian rust agent). Transcripts of the gene *Glyma06g07070* were not detected in any experiment. An increase in the genes' expression was observed after

different treatment times after the *P. pachirizi* urediniospores inoculation, and in response to ABA and salicylic acid treatments. Salt treatment repressed the expression of *Glyma14g14220* and *Glyma17g32100*. The results reinforce the possibility of HyPRP involvement in biotic and abiotic responses.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja no contexto mundial

Assim como outras leguminosas, a soja [*Glycine max* (L) Merrill] é capaz de obter o nitrogênio através de uma interação endossimbiótica com bactérias diazotróficas que infectam suas raízes. Essa é uma grande vantagem, pois, além de diminuir os custos com a lavoura, uma vez que dispensa a utilização de adubos nitrogenados, contribui para a diminuição da contaminação do solo e do lençol freático, ocasionada pelo acúmulo deste micronutriente (Marx *et al.*, 2004; Kaown *et al.*, 2007).

Do ponto de vista medicinal, a soja apresenta diversas propriedades curativas e preventivas, atuando de maneira benéfica no tratamento e prevenção do câncer e da osteoporose. Plantas de soja produzem isoflavonas, saponinas e compostos fenólicos antioxidantes, os quais têm demonstrado serem benéficos à saúde humana, quando ministrados de maneira orientada (Messina, 1999; Lee *et al.*, 2000).

Empregada na produção de biocombustíveis, a soja é uma fonte de energia renovável e menos poluidora do que a geração de energia a partir de combustíveis fósseis, fato que tem merecido destaque junto aos interesses econômicos mundiais. Dentre os biocombustíveis estão o etanol e o biodiesel, sendo o segundo gerado a partir de triacilgliceróis presentes em grãos oleaginosos como os da soja. Hill e colaboradores (2006) compararam o biodiesel de soja com o etanol gerado a partir do milho, evidenciando-se inúmeras vantagens no uso da soja, tais como porcentagem maior de energia gerada por quilo de grão, menor necessidade de adubação e de emprego de pesticidas e menor carência de insumos por hectare cultivado.

A soja apresenta-se, em um cenário mundial, como um dos grãos mais consumidos. Grande parte da proteína e óleo consumidos no mundo provém dos grãos de soja. Ela é a maior fonte de proteínas usadas na alimentação animal e humana, visto que é constituída de mais proteínas que outras fontes de alimento comumente usadas, tais como carne bovina, queijo e peixe (Krishnan, 2005; Cooper *et al.*, 2008).

Em 2009, o Brasil produziu 57 milhões de toneladas de grãos de soja, posicionando-se logo após os Estados Unidos da América (EUA), cuja produção foi de 76,6 milhões de toneladas. Na produção brasileira, o estado do Rio Grande do Sul contribui com 11% da safra do país. A safra da soja rendeu, em 2008, uma receita de US\$

27,4 bilhões para os EUA e rende, anualmente, em torno de R\$ 18,4 bilhões ao Brasil. Há a estimativa de que até o ano de 2017 o Brasil torne-se o maior produtor e exportador mundial de soja, retendo 34% de toda produção, seguido pelos EUA com 30% e Argentina com 20%. O maior mercado consumidor é, atualmente, a China, que, em 2003, importou 20,7 milhões de toneladas de grãos de soja (Tuan *et al.*, 2004; IBGE, 2009; USDA, 2009).

A perspectiva de aumento na produtividade da soja no Brasil poderá ser concretizada com o aumento das áreas cultivadas e o aumento da produtividade por hectare plantado. Para tal, políticas agrícolas adequadas e investimento em biotecnologia serão fundamentais. Atualmente, a biotecnologia está desencadeando a chamada “Segunda Revolução Verde”, sendo a transgenia a principal ferramenta viabilizadora do processo de geração de cultivares mais produtivas (Sasaki *et al.*, 2004).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com as mudanças climáticas consequentes do aquecimento global, poderá ocorrer uma perda econômica de R\$ 4 bilhões até 2020, resultado de uma redução de quase 24% da área apta para plantio de soja no Brasil. As perdas poderão chegar a R\$ 7,6 bilhões em 2070, decorrentes de uma diminuição de 40% da área apta para o plantio. A região que mais deve sofrer os impactos é a Região Sul (MAPA, 2008).

Estresses abióticos e necessidade do desenvolvimento de novas cultivares

Devido à sua natureza sésil, as plantas frequentemente enfrentam condições adversas ou estresses bióticos e abióticos, o que, muitas vezes, conduz a uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Tais mudanças podem causar danos aos vegetais, uma vez que reagem com seu potencial genético e limitam seu crescimento, reprodução e produtividade (Mahajan e Tuteja, 2006).

Dentre os estresses abióticos mais severos figura o déficit hídrico (ou seca), que ocorre quando em células ou tecidos o conteúdo de água está abaixo do que estaria em condições ótimas de hidratação. Três estágios moleculares distintos podem ser manipulados, na tentativa de gerar uma planta com maior tolerância à seca. Estes são: a percepção, pela planta, do estímulo de déficit hídrico; a sinalização; e o controle da transcrição de genes vegetais em resposta ao déficit hídrico (Zhu, 2002). Uma resposta mais abrangente e eficaz tem sido obtida com alterações nos níveis iniciais da cascata

gênica de resposta à seca. Isso ocorre porque elementos, tais como fatores de transcrição, induzem uma mudança fisiológica muito mais abrangente nas plantas do que as proteínas envolvidas nas etapas terminais do processo de preparação do organismo para administrar a condição de seca (Nelson *et al.*, 2007).

Estudos de genômica funcional são imprescindíveis para o desenvolvimento de novas cultivares, que respondam às necessidades das mudanças climáticas. Tais estudos permitem o entendimento do funcionamento de genes vegetais, os quais poderão ser empregados no remodelamento de genomas. Isso pode ser alcançado através do emprego de técnicas moleculares, como o silenciamento de genes que condicionam características indesejadas ou a superexpressão daqueles responsáveis por características agronomicamente interessantes, mas que são ausentes ou pouco expressas na espécie ou cultivar de interesse.

A modulação de fatores de transcrição, como Y (NF-Y) de *Arabidopsis thaliana*, permite induzir grandes mudanças fisiológicas na planta, que passa a suportar condições muito mais severas de déficit hídrico do que a planta selvagem é capaz (Nelson *et al.*, 2007). Como já mencionado, a modulação da expressão de proteínas que atuam em um passo mais adiantado na cascata de resposta à seca tem um espectro de ação mais reduzido, quando comparado à manipulação de fatores de transcrição, que modificam a expressão de toda uma rede gênica. No entanto, resultados positivos já foram obtidos com a superexpressão de proteínas, como osmólitos e chaperonas, que auxiliam a célula a lidar com o desequilíbrio osmótico (He *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2006).

Uma vez que a soja tem participação importante na economia mundial, a comunidade científica uniu esforços para formar o Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma da Soja (*The International Soybean Genome Consortium - ISGC*), visando um estudo aprofundado dessa leguminosa, a partir dos dados obtidos com o sequenciamento de seu genoma. Desse consórcio fazem parte os países Brasil, China, Japão, Coréia e Estados Unidos da América.

O sequenciamento do genoma da soja, publicado em 14 de janeiro de 2010 por Schmutz e colaboradores, foi realizado por diversos grupos (por exemplo, os coordenados pelos pesquisadores D. Rokhsar, S. J. Schmutz e G. Stacey da Universidade de Missouri-Columbia; R. Shoemaker da Universidade Estadual de Iowa; e S. Jackson da Universidade de Purdue) que depositaram as sequências no banco de dados Phytozome. Tendo a soja um

genoma de 950 Mb, seu sequenciamento requereu tempo e recursos financeiros para que houvesse boa cobertura e anotação das sequências (Schmutz *et al.*, 2010).

Com o adiantado progresso dos projetos de sequenciamento do genoma da soja, a tarefa de isolamento de novos genes ficou bastante facilitada. A identificação de genes ortólogos, já conhecidos em outros organismos e a predição, através de bioinformática, de fases abertas de leitura (ORFs) e até mesmo a montagem de estratégias de silenciamento foram enormemente otimizadas.

No Brasil, o projeto GENOSOJA-CNPq propôs a união de esforços que vinham sendo conduzidos individualmente por diferentes grupos de pesquisa no Brasil e a formação de um Consórcio Nacional para Estudo do Genoma da Soja, que se integrará ao Consórcio Internacional. A perspectiva é que a integração das informações geradas no projeto, nos diferentes níveis (estrutural, transcricional, proteico e funcional), através de ferramentas de bioinformática, auxiliará na compreensão da função e dos mecanismos de controle da expressão de genes presentes na soja e envolvidos em diferentes processos de desenvolvimento e/ou defesa contra estresses ambientais (bióticos e abióticos). O projeto nacional está sendo coordenado pelo Dr. Ricardo V. Abdelnoor, pesquisador da Embrapa Soja, e executado pelas seguintes Instituições de pesquisa no país: Embrapa Soja, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Estadual Paulista, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Estadual de Campinas, Universidade Federal do Paraná e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Integrante do Consórcio Nacional acima mencionado, o Laboratório de Genética Molecular Vegetal, do Departamento de Genética da UFRGS, ficou responsável pela condução de experimentos relacionados ao estudo de genes envolvidos na resposta a estresses bióticos (fungos) e abióticos (seca). Mais especificamente, nosso grupo ficou responsável pelo estudo de genômica funcional de genes ligados à resposta da planta à seca. O gene escolhido para o presente estudo foi o gene de soja codificador da proteína SbPRP (*Soybean Proline Rich Protein*). No trabalho de He e colaboradores (2002) foi verificado um aumento no perfil de expressão deste gene em folhas e epicótilos de soja, quando a planta foi submetida à falta de água e ao estresse salino.

O gene *SbPRP* de soja apresenta uma sequência de 381 pares de base e a proteína SbPRP tem 126 aminoácidos. Esse gene, curiosamente, não possui sequências intrônicas

interrompendo a sequência codificante, o que dispensa a necessidade da obtenção de cDNA para clonagem da região codificante madura. A proteína SbPRP de soja é composta por três domínios conservados: domínio rico em prolinas (17 aminoácidos), um longo domínio hidrofóbico, rico em cisteínas (84 aminoácidos) e um peptídeo sinal (25 aminoácidos) na sua porção N-terminal. O gene codificador dessa proteína responde, também, a tratamentos com ácido salicílico e à inoculação com o vírus do mosaico da soja, podendo, assim, ser considerada uma proteína de defesa da soja. Entretanto, o real papel fisiológico desta proteína permanece desconhecido (He *et al.*, 2002).

A parede celular e suas glicoproteínas

A parede celular vegetal foi, por muito tempo, negligenciada quanto à sua real importância, sendo considerada uma estrutura celular inerte. No entanto, sabe-se que essa estrutura possui características únicas de organela, estrutura e ação enzimática (Lamport, 1965). A parede celular responde aos estímulos intracelulares, como o de crescimento, e auxilia a célula a responder a estímulos externos, como, por exemplo, o ataque de patógenos (Hahn *et al.*, 1981).

Além da sua importância no contexto celular, a parede celular vegetal tem uma participação direta na economia humana. A maior parte de todo o carbono fotossinteticamente fixado é incorporado na parede celular, tornando esta a maior fonte de biomassa terrestre renovável. Essa biomassa é de suma importância na nutrição animal e humana, sendo, também, muito empregada na indústria têxtil (Reiter, 2002).

Para execução de seu papel, que vai além do estrutural, a parede celular vegetal associa-se a proteínas, dentre as quais estão glicoproteínas com função estrutural e/ou enzimática. As glicoproteínas encontradas na matriz extracelular são constituídas basicamente por dois grupos: a) proteínas arabinogalactanas, que são solúveis e, b) as extensinas, que são insolúveis.

As proteínas arabinogalactanas têm de 90 a 95% de sua estrutura constituída por carboidratos, sendo, em sua maioria, galactose e arabinose. Sua função tem sido relacionada com a capacidade do pólen de aderir-se no estigma, pois elas conferem viscosidade e capacidade de agregação. Outra função seria a de um papel nutritivo no estilete, fornecendo carboidratos precursores para a parede celular do tubo polínico crescente. Papéis na diferenciação celular e no balanço hídrico também têm sido propostos

(Sommer-Knudsen *et al.*, 1998).

As extensinas mostram-se reguladas pelo desenvolvimento, sendo induzidas por lesão nos tecidos, pela ação de elicitores, ataques fúngicos e por infecção de nematoides (Josè *et al.*, 1994; Eycken *et al.*, 1996).

Outros grupos menos estudados e com função menos conhecida, também presentes na matriz extracelular, são as proteínas ricas em prolina (PRPs) e as proteínas híbridas ricas em prolina (HyPRPs).

A parede celular perante o estresse hídrico

A parede celular tem funções conhecidas, tais como determinar o tamanho e o formato das células vegetais. Resistindo ao turgor celular, a parede controla o crescimento e formato que a célula assumirá em determinado tecido (Taiz, 1984). Ela é, também, o primeiro obstáculo que o patógeno tem de sobrepor a fim de penetrar na célula. A relação patógeno-hospedeiro é uma condição co-evolutiva que vem pressionando seletivamente por milhões de anos, tanto os vegetais para o impedimento da invasão do patógeno, quanto os patógenos para adaptação às novas barreiras impostas pelos vegetais. Uma vez que o patógeno comece um ataque à célula vegetal, muitas vezes vale-se de enzimas que degradam a parede celular, transformando-a em fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento. As plantas reagem após reconhecerem elicitores, como, por exemplo, componentes da própria parede celular que tenham sido hidrolisados. Mas a primeira linha de defesa, além da barreira mecânica imposta pela parede celular, é a presença de enzimas inibitórias, que estão presentes na própria parede celular, e que bloqueiam a ação das enzimas dos patógenos, dificultando a progressão do invasor pelos tecidos vegetais (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Em relação ao déficit hídrico, a primeira mudança celular é a redução de turgidez. Com a redução ocorre uma diminuição na pressão sob a parede celular, afetando várias atividades, tais como a expansão foliar e o alongamento das raízes. Coordenadamente ocorrem alterações na síntese de parede celular e de membranas, divisão celular e síntese proteica (Burssens *et al.*, 2000).

Segundo Green e colaboradores (1971), a taxa de crescimento celular é dada pela seguinte fórmula:

$$GR=m(\psi_p-Y)$$

Onde:

GR = Taxa de crescimento

m = Extensibilidade da parede celular

ψ_p = Turgidez

Y = Limiar de amolecimento (pressão que a parede celular ainda aguenta sem deformação)

Assim, segundo a equação, percebe-se que diminuição na turgidez (ψ_p) acarreta queda na taxa de crescimento (GR). Com isso, uma vez que o turgor (ψ_p) celular atinja um valor igual ao valor do limiar de amolecimento (Y), a expansão celular é cessada.

Outra variável importante é a extensibilidade da parede celular (m). A extensibilidade da parede celular varia conforme oscilações do pH. Um pH mais ácido é mais propício para a extensão da parede celular. O estresse hídrico tem a capacidade de elevar o pH da solução da parede celular, causando um deslocamento no limiar de amolecimento (Y) desta (Taiz e Zeiger, 2009). Segundo estes autores, plantas que são submetidas a um déficit hídrico por curto espaço de tempo, quando reidratadas não readquirem uma GR ótima de imediato. Isso se deve ao fato de que, apesar do turgor celular (ψ_p) ter sido plenamente recuperado, a extensibilidade da parede celular (m) demora mais tempo para ser restaurada a valores ótimos para o crescimento celular.

Sendo grande a participação da parede celular nos processos consequentes ao estresse hídrico, vários genes têm sua regulação alterada mediante alta salinidade, seca e baixas temperaturas (Parker *et al.*, 2006, Zhang e Schläppi, 2007, Molina *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2009).

Proteínas híbridas ricas em prolina (HyPRP)

Proteínas Ricas em Prolinas (PRP)

São glicoproteínas ricas em resíduos de prolina ligadas a um peptídeo sinal direcionador para parede celular. Não possuem o elemento repetitivo SerPro₄ e por isso são menos glicosiladas que outras glicoproteínas tais como as extensinas. (José e Puigdomènech, 1993). Sua expressão está associada principalmente com protoxilema e xilema. Existem registros de ocorrência em dicotiledônias, monocotiledônias e fungos

(Perfect *et al.*, 1998, Hong *et al.*, 1990, Vignols, *et al.*, 1999).

Estrutura das HyPRPs

As proteínas híbridas ricas em prolina (HyPRP), consideradas uma subdivisão das PRPs, são glicoproteínas bimodulares que apresentam um sacarídeo conjugado a um de seus aminoácidos, um peptídeo sinal direcionador para parede celular (PS), um domínio intermediário rico em prolinas (PRD), cuja repetição mais comum é PPVYK, e um motivo carboxi-terminal com oito resíduos de cisteína conservados (8CM) (Fig. 1). A presença do domínio 8CM, que está ausente nas PRPs, justifica a nomenclatura do subgrupo como PRP “híbrida” (HyPRP) (José-Estanyol e Puigdomènech, 2000). Devido ao fato da proteína SbPRP, estudada por He e colaboradores (2002), conter o domínio 8CM, no presente trabalho ela será classificada como pertencente à sub-família HyPRP, assim como também serão os demais membros estudados.



Figura 1: Figura esquemática da estrutura das proteínas HyPRP. SP: Peptídeo sinal; PRD: Domínio Rico em Prolina; 8CM: Motivo com 8 resíduos de cisteína conservados.

O domínio terminal rico em resíduos de cisteína (8CM) pode variar em número e organização, o que permite a classificação das HyPRPs em dois grupos, A e B. O primeiro desses grupos possui o domínio A que apresenta a seguinte sequência de resíduos de cisteína (...C..C...C...C...C...C...), os pontos entre as cisteínas indicam a ocorrência de aminoácidos quaisquer (José-Estanyol e Puigdomènech, 1994). Um membro deste grupo é a proteína PvPRP de *Phaseolus vulgaris*, que tem sua expressão reduzida após ataque fúngico, devido à ligação da proteína fúngica (PRP1-BP) que se liga em uma região rica em U na porção 3' UTR do mRNA de PvPRP, desestabilizando-o (Zhang e Mehdy, 1994).

O segundo grupo possui o domínio B na porção C-terminal, apresentando oito resíduos de cisteína na seguinte disposição [...C...C...CC...CXC...C...C... (onde o X representa a presença de um único aminoácido qualquer e os pontos indicam a ocorrência de aminoácidos quaisquer, José-Estanyol e Puigdomènech., 1994)]. A proteína MsACIC de *Medicago sativa*, que pertence a este grupo, tem sua expressão induzida por injúria

causada na coroa da alfafa (Castonguay *et al.*, 1994).

O domínio 8CM está presente em proteínas com diferentes funções já descritas, como por exemplo, estocagem nutricional (2s-albuminas), proteção e inibição enzimática (inibidoras de amilase e inibidoras de tripsina), transferência de lipídeos [proteínas transportadoras de lipídeos (LTP)] e estrutura da parede celular (José-Estanyol *et al.*, 2004).

Em adição aos oito resíduos de cisteína presentes no motivo 8CM, outros dois resíduos de cisteína são encontrados entre o peptídeo sinal e o domínio rico em prolinas (José-Estanyol e Puigdomènech, 1994).

O domínio PR das HyPRPs pode variar em tamanho, indo de 292 resíduos de aminoácidos, como em *Medicago truncatula* (MsPRP2, Deutch *et al.*, 1995), até 19 resíduos, como em *Ricinus communis* (Rcc3, Xu *et al.*, 1995). Sua função é desconhecida.

Apesar das HyPRPs não terem tido sua estrutura terciária resolvida por cristalografia, provavelmente seu domínio conservado 8CM se estrutura da mesma maneira que o faz em outras proteínas já bem resolvidas tridimensionalmente, tais como as PRPs e as LTPs (*Lipid Transfer Protein*) (Lenka *et al.*, 2007).

Baud e colaboradores, em 1993, analisaram por cristalografia a proteína hidrofóbica de soja (HSP). Em seu trabalho, os autores mostraram que essa proteína possui 80 resíduos de aminoácidos com quatro hélices hidrofóbicas estabilizadas por cisteínas conservadas, pertencentes ao domínio rico em cisteínas (8CM). A mesma proteína também apresenta um grande número de resíduos hidrofóbicos. O domínio amino terminal mostrou-se extremamente hidrofóbico e a maior parte dos resíduos existem na sua forma amida. A região carboxi terminal mostrou-se levemente hidrofílica. Na estrutura secundária foram preditas seis folhas beta, seis voltas beta e uma pequena hélice alfa.

Por serem glicoproteínas, as HyPRPs são difíceis de caracterizar, devido à necessidade de se obter diferentes peptídeos com o carboidrato ligado a eles. A tecnologia recombinante, baseada no isolamento do gene com base nas informações contidas nos bancos de dados ou na obtenção dos cDNAs codificadores dos genes, não responde questões quanto à posição correta a qual se ligaria a molécula de açúcar.

As HyPRPs são caracterizadas por um baixo nível de glicosilação (José e Puigdomènech, 1993), podendo ser N- ou O-glicosiladas. No entanto, ocorrem proteínas sem glicosilação. Isso pode acontecer devido à ausência da maquinaria responsável por tal

processo ou por uma conformação terciária assumida pela proteína que impossibilite o acesso ao sítio de glicosilação. Em geral, a porção de carboidrato está ligada a um intermediário lipídico e é transferida à cadeia polipeptídica nascente. Na N-glicosilação, a ligação de um resíduo de asparagina ao grupo amida forma uma ponte N-glicosilamina. Na O-glicosilação todos os açúcares são adicionados sucessivamente, pela transferência de seus derivados nucleotídicos e pela atividade de glicosiltransferases específicas no complexo de Golgi (Han *et al.*, 1992).

Função e Expressão Gênica das HyPRPs

A função das HyPRPs não está clara até o momento. Analisando os resíduos de aminoácidos foi possível fazer a predição de que o domínio hidrofóbico C-terminal (8CM) provavelmente permite que as proteínas HyPRPs ancorem-se na membrana celular de maneira orientada à parede celular (Bohlmann, 1991; Youl *et al.*, 1998).

A análise de sequências de resíduos de aminoácidos (alta quantidade de resíduos de tirosinas) indica que as PRPs são boas candidatas à resposta ao estresse oxidativo causado por ferimentos, elicitores de resposta hipersensitiva e tratamento com elicitores. Sua rápida insolubilização reforça a parede celular, barrando a invasão de patógenos (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994).

As HyPRPs apresentam um padrão de expressão ainda pouco estudado. Manifestam-se em amplo espectro, ocorrendo em muitos órgãos e tecidos de espécies já estudadas. Apresentam padrão de expressão muito variado, mesmo entre membros homólogos. No entanto, essa expressão é sempre muito específica para um determinado estado de desenvolvimento da planta ou é o resultado de indução por hormônio ou estresse, ou repressão pelos mesmos motivos (Lenka *et al.*, 2007).

Os dados contidos na Tabela 1 abaixo evidenciam a amplitude do padrão de expressão das HyPRPs. Tais proteínas são expressas em variados tecidos e órgãos: estilete; zona de deiscência; folhas, assim como em variadas condições: indução por frio; indução por estresse salino; presença de sacarose, na ausência de auxina, etc.

Tabela 1: Padrão de expressão das HyPRPs nos mais variados tecidos e espécies vegetais. A porcentagem de identidade C-terminal é dada em comparação com PvPRP1 de *Phaseolus vulgaris* para o grupo A e com ZmHyPRP de *Zea mays* para o grupo B. Modificada de José-Estanyol e Puigdomènech, 2000.

HyPRPs com domínio A rico em resíduos de cisteína							
Nome	Cisteínas	Sequência	Material	Aminoácidos	Expressão	Identidade	Repetições
PvPRP1	4	cDNA completo	Células de feijão tratadas com elicitores	297	Células e tecidos de feijão	100	PVHPPVKPP
NaClassIII	6	cDNA completo	Estigma e estilete de tabaco	426	Tecido de transmissão do estilete	42.8	SPPPP
HyPRPs com domínio B rico em resíduos de cisteína							
Nome	Cisteínas	Sequência	Material	Aminoácidos	Expressão	Identidade	Repetições
MSACIC	8	cDNA completo	alfafa	166	Induzida por frio	59.75	Spx;TPx
MsPRP2	8	genômica	alfafa	381	Induzida por sal	64.70	PPXVPZ
DC 2.15	8	cDNA completo	Cultura celular de cenoura crescida em meio sem 2,4-D	137	Embriogênese somática inicial	47.94	PPVVPVT; PPVH; PPXVZ
CR14KDA	8	cDNA completo	<i>Catharanthus roseus</i>	138	Cultura celular induzida por sacarose em meio livre de auxina	51.80	PKP
CrHyPRP	8	cDNA completo	<i>Cuscuta reflexa</i>	329	Região subapical da planta	66.66	PPXYP; PPHYP; PPXYK
SAC51	8	cDNA completo	<i>Brassica napus</i> / Zona de deiscência	147	Zona de deiscência da vagem	51.22	(PX) _n
BNPRP	8	Genômico e cDNA	<i>Brassica napus</i>	376	Frio induzido na folha	63.09	KPPK; KPPTVKPPP; STPKPPT; PPVVTPT
ADR11-2	8	cDNA incompleto	Hipocótilo maduro de soja	151	Hipocótilo em desenvolvimento	57.31	PXX; PPXXX
PvR5	8	cDNA completo	Raízes de feijão	127	raízes	54.93	PnX; PnK
CELP1	8	cDNA completo	Flor de tabaco	209	Flor de tabaco	-	XP(3-7); SPPPP
CELP2	8	cDNA completo	Flor de tabaco	196	Flor de tabaco	21.53	XP(3-7); SPPPP
NT16	8	cDNA completo	Tumor da galha em tabaco	170	Tumor da galha, raiz, folhas machucadas	45.88	GGGSGN
TPRP-F1	8	Genômico	Tomate	346	Fruta jovem de tomate	67.85	PPIV; PPST; PTPP
HSP	8	Proteína	Soja	80	Semente de soja	40.0	nd
ZmHyPRP	8	Genômico	Milho	301	Ovário e embriões imaturos	100.00	PPTPRPS; PPYV

Evolução das HyPRPs

As HyPRPs ocorrem em todo o reino vegetal. Os genes correspondentes a essas proteínas já foram identificados e clonados de diferentes espécies de angiospermas e gimnospermas. Até agora, no entanto, as HyPRPs não foram encontradas em bancos de dados de plantas sem semente, algas, como *Chlamydomonas reinhardtii*, e musgos, como *Physcomitrella patens*. Isso pode indicar que tais proteínas possam representar uma novidade evolutiva exclusiva das gimnospermas e angiospermas (mono e dicotiledôneas). Sugere-se que o domínio que caracteriza as HyPRP tenha surgido posteriormente na evolução dos vegetais pela inserção em fase de um elemento repetitivo rico em códons para prolina na porção N terminal, adicionando o domínio rico em resíduos de prolina (PRD) na proteína original (Lenka *et al.*, 2007).

Variados grupos proteicos com funções distintas apresentam muita similaridade de estrutura com o domínio C-terminal de oito resíduos de cisteína (8CM) das HyPRPs. Entre eles estão os domínios das HSPs, LTSs, prolamina de estocagem, proteína 2S de estocagem e proteínas inibidoras alfa amilase/tripsina de endosperma de cereal. Isso indica a provável existência de um gene ancestral comum que, tendo acumulando modificações que não alterassem a estrutura básica da proteína, conseguiu adquirir novas funções (Henrissat *et al.*, 1988).

A recente origem das HyPRPs também é sugerida pelo fato de que, quando feita uma análise filogenética envolvendo membros de diversas espécies vegetais, os únicos ramos estatisticamente significativos correspondem a membros da mesma espécie ou da mesma família (Lenka *et al.*, 2007).

Todas as espécies de genes *HyPRP* até agora analisadas possuem famílias com muitos membros, variando em torno de 14 a 52, como está demonstrado na Tabela 2. As angiospermas exibem sinais de recente diversificação, tais como várias duplicações em tandem independentes em mais de um locus. Esses grupos de genes estruturados em tandem apresentam altos valores de *bootstrap* entre si, indicando duplicações recentes. Em alguns casos, como nos grupos encontrados no cromossomo 1 de *Arabidopsis thaliana*, valores baixos de *bootstrap* podem indicar duplicação antiga ou conversão gênica (Lenka *et al.*, 2007).

Tabela 2: Número de membros de genes *HyPRP* encontrados em espécies de angiospermas e gimnospermas. Dados reunidos por Lenka e colaboradores (2007).

Espécie	Número de membros <i>HyPRP</i>
<i>Solanum tuberosum</i>	16
<i>Arabidopsis thaliana</i>	28
<i>Medicago truncatula</i>	14
<i>Lycopersicon esculentum</i>	19
<i>Oryza sativa</i>	31
<i>Zea mays</i>	52
<i>Pinus taeda</i>	21

Comparando-se as sequências de genes codificadores de HyPRPs das espécies *A. thaliana* e *Solanum tuberosum*, poucos genes ortólogos podem ser claramente identificados. Esse resultado indicaria a ocorrência de uma rápida divergência após a divisão da linhagem antecessora em Brassicacea e Solanacea. Somado a isso, o perfil de expressão entre esses genes ortólogos é bastante divergente (Lenka *et al.*, 2007).

O domínio mais conservado das HyPRPs, 8CM, normalmente usado nas análises filogenéticas, nem sempre é suficientemente conservado para gerar valores de *bootstrap* estatisticamente confiáveis. Na tentativa de suprir essa lacuna, a associação com resultados de expressão gênica permite uma maior confiabilidade na consistência dos grupos como tendo um real significado biológico. Essa dificuldade na identificação de ortólogos pode ser consequente ao fato de que os motivos que compõem essa família proteica são muito dinâmicos, permitindo variadas mutações sem tornar a proteína não funcional. Esse dinamismo tem como consequência uma pressão seletiva menos estrigente nas HyPRPs, possibilitando uma rápida diversificação e dificultando a identificação de genes ortólogos ancestrais. Como já mencionado, a maioria dos ramos estatisticamente suportados consiste de proteínas de uma mesma espécie ou de uma mesma família (Lenka *et al.*, 2007).

Estresses bióticos e abióticos

As plantas estão constantemente expostas a mudanças ambientais em resposta, às quais precisam estar modulando sua expressão gênica, a fim de reprogramar seu estado fisiológico. Quando tais mudanças causam prejuízo para a planta, essas constituem o

estresse, ao qual estão expostos os vegetais. Devido ao estresse resultante de condições climáticas e edáficas subótimas, a produtividade de lavouras nos Estados Unidos representa apenas 22% da produtividade potencial genética (Boyer, 1982).

As condições ambientais também determinam a distribuição das espécies vegetais. A capacidade de ajustar-se aos estresses é o fator determinante para uma espécie poder ou não ser cultivada em determinada área. Essa é uma questão de suma importância para a agricultura.

Os estresses aos quais as plantas podem sujeitar-se não podem ser analisados separadamente, pois, muitas vezes, induzem respostas de tolerância cruzada. Por exemplo, excesso de salinidade no solo leva ao déficit hídrico, mas, também, ao estresse por calor, devido ao menor resfriamento das folhas que seria executado pela transpiração, que agora é insuficiente (Taiz e Zeiger, 2009).

Déficit hídrico

O déficit hídrico ocorre quando, em células ou tecidos, o conteúdo de água está abaixo do que estaria em condições ótimas de hidratação (Taiz e Zeiger, 2009).

A seca e o estresse salino são os grandes responsáveis pelas perdas na agricultura causadas pelo déficit hídrico, considerados grandes determinantes da produtividade mundial na agricultura (Epstein *et al.*, 1980).

A flora terrestre é constantemente pressionada de forma seletiva a realizar a manutenção de adaptações vantajosas para a sobrevivência perante o estresse hídrico. Esse provavelmente tenha sido, desde os primórdios da vida vegetal terrestre, um dos maiores desafios à vida, e, por isso, muitas características (morfológicas, anatômicas, moleculares) têm sido selecionadas em função dessa pressão seletiva. Os mecanismos adaptativos de resistência à seca podem ser divididos basicamente em três grupos: 1) Retardo da dessecação: capacidade de manter a hidratação do tecido; 2) Tolerância à dessecação: capacidade de funcionar com pouca água nos tecidos; 3) Escape da seca: plantas que completam seu ciclo reprodutivo na estação úmida (Taiz e Zeiger, 2009).

O estresse osmótico no exterior celular leva à perda de turgor pela célula, levando à necessidade, pela planta, de uma série de respostas. As plantas respondem, por exemplo, acumulando osmólitos para reduzir a perda de água (Li *et al.*, 2006).

A alta salinidade também é prejudicial para o desenvolvimento vegetal, causando

distúrbios na homeostase iônica celular, necessidade de reparação de danos, detoxificação e perturbação na dinâmica de crescimento celular. Altas concentrações de sódio no citosol são tóxicas por diminuir criticamente a energia molar livre da água, levando a célula a iniciar uma retirada do excesso de sódio através de canais iônicos antiporte e simporte, localizados nas membranas vacuolares e plasmáticas. Esse fluxo iônico tem custo energético e causa um desequilíbrio iônico que tem de ser restaurado (Kinraide *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2003).

A resposta ao estresse salino e osmótico desencadeia a transdução de sinal para diferentes rotas metabólicas na planta (ativação de proteínas quinases, fosfolipases, ABA), conforme demonstrado na Figura 2. As respostas das plantas à seca e ao estresse salino estão intimamente relacionadas, ocorrendo uma sobreposição de mecanismos. Sendo o estresse salino muito mais preciso, fácil de ser controlado e repetido em condições laboratoriais ele é, muitas vezes, usado como modelo experimental preferencial para simular condições de estresse hídrico (Zhu *et al.*, 2003).

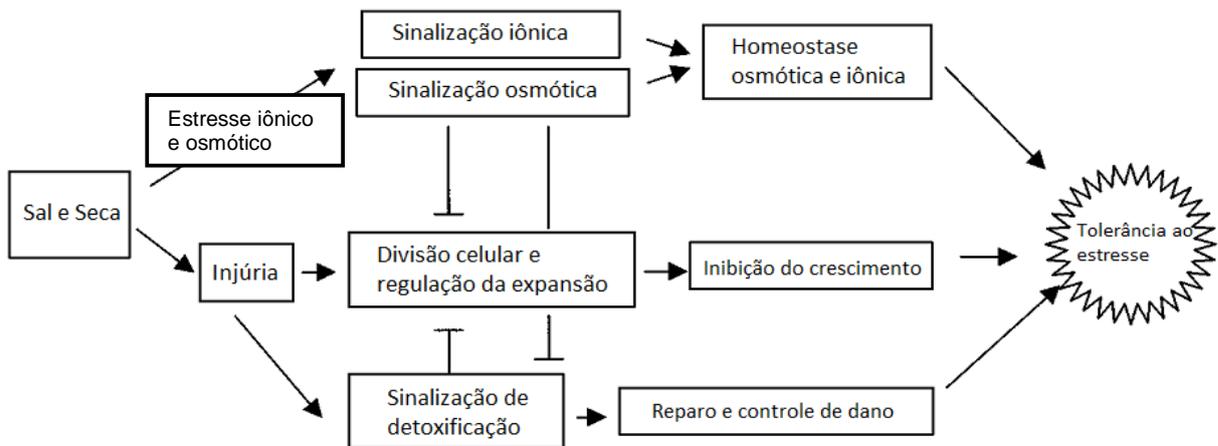


Figura 2: Vias de resposta da planta ao estresse salino e à seca. A planta responde buscando a homeostase iônica, reconfigurando as taxas de crescimento celular e ativando as vias de reparação e detoxificação. Modificada de Zhu, 2002.

Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) tem um amplo espectro de ação no desenvolvimento vegetal (dormência da semente, germinação, crescimento da plântula). No entanto, seu papel principal está relacionado com o balanço hídrico (Zhu, 2002). Como exemplo disso,

mutantes de *Arabidopsis thaliana*, deficientes na síntese de ABA, têm desenvolvimento relativamente normal, exceto quando desafiados por uma situação de estresse hídrico (Koorneef *et al.*, 1998).

Além de controlar a abertura dos estômatos, induzindo as células-guarda a diminuírem seu turgor através do efluxo de K^+ e ânions, o ABA induz a expressão de diversos genes de tolerância à desidratação (Xiong *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2001).

O acúmulo de ABA em uma planta sob estresse osmótico se dá devido a um aumento na sua síntese e na inibição de sua degradação (Zhu, 2002).

Ácido Salicílico

O ácido salicílico (AS) é um hormônio vegetal envolvido, principalmente, na resposta a ataques de patógenos, floração e termogênese.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes em AS não conseguem florescer quando submetidas a estresse com luz UV, enquanto que em condições ótimas elas florescem mais tardiamente do que plantas selvagens, evidenciando o envolvimento do AS com a floração (Martinez *et al.*, 2004).

A indução de termogênese, que ocorre em certas espécies vegetais como em *Sauromatum guttatum*, da família Araceae, e na estrutura reprodutiva masculina das Cicadáceas, ocorre devido ao acúmulo de AS. Foi mostrado que o AS é capaz de aumentar a atividade de cadeia respiratória alternativa nas mitocôndrias, desviando a energia que seria usada na síntese de ATP para a geração de calor e consequente aumento de temperatura (Norman *et al.*, 2004).

Em relação à resposta a ataques de patógenos, o AS tem participação em várias respostas imunes das plantas, entre elas resistência sistêmica adquirida (SAR), resistência mediada por genes R (ETI) e resistência basal (PTI). Uma complexa rede genética regulatória pode atuar tanto à montante quanto à jusante do AS. Sendo à montante respostas independentes da indução de genes através de interação com o ácido salicílico e a jusante respostas dependentes da indução de genes ativados por complexos SA-Proteína (Vlot *et al.*, 2009).

Ferrugem Asiática

A ferrugem asiática é causada pelo fungo *Phakospora pachyrhizi*. É uma das

fitopatologias que mais prejudica a lavoura de soja atualmente. Essa doença foi descoberta por volta de 1900 e, desde então, tem se espalhado pelo mundo. Uma vez instalada em uma área, perdas na produtividade de 10% a 80% podem ser atingidas (Patil *et al.*, 1997).

A severidade das perdas depende de inúmeros fatores: a cultivar que está plantada no local afetado, da fase do desenvolvimento em que a ferrugem atacou a lavoura, das condições ambientais, entre outros.

Na ausência de uma cultivar com perfil genético de longa resistência, enormes gastos são feitos no emprego de fungicidas, na tentativa de diminuir as perdas causadas pela moléstia fúngica.

As cultivares são resistentes a linhagens específicas de *Phakopsora pachyrhizi*. Cada cultivar resiste à invasão através de uma estratégia específica. O locus *Rpp1* (*Resistance to Phakopsora pachyrhizi* 1) confere à planta uma resposta imune, a qual não chega a mostrar sinais de ataque do fungo. Já os loci *Rpp2* e *Rpp5* limitam o crescimento fúngico através de uma lesão similar àquela causada por resposta hipersensitiva (Garcia *et al.*, 2008).

Uma das grandes dificuldades no controle da dispersão e manutenção do fungo *Phakopsora pachyrhizi* é o fato de que este é capaz de infectar diversas espécies pertencentes ao grupo das Fabaceae, conseguindo, assim, resistir ao inverno e aos períodos de vazio sanitário, acumulando inóculo (Bromfield *et al.*, 1984). A soja apresenta poucos acessos com resistência à ferrugem asiática, quando comparada a outras leguminosas e outras espécies vegetais. Uma possível explicação seria a de que o custo da manutenção desses alelos em linhagens selvagens seria alto demais, não compensando as perdas durante os ataques de *Phakopsora pachyrhizi* (Meyer *et al.*, 2009).

A descoberta de genes de resistência à ferrugem asiática é uma das possibilidades mais promissoras no combate a este patógeno.

Processo de infecção da planta de soja por *Phakopsora pachyrhizi*

Entre uma e duas horas após a inoculação das plantas de soja, os urediniosporos germinam nas folhas e formam um tubo germinativo (Bonde *et al.*, 2006). Em duas horas as extremidades dos tubos germinativos crescem rapidamente pelo acúmulo de líquidos, para formar o apressório na parede das células epidérmicas (Bonde *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 1983). Após sete horas, um cone apressorial é formado no interior do apressório e uma

hifa de penetração atravessa a epiderme celular. Após 15 a 20 horas, um septo é formado pela hifa de penetração no espaço intercelular, dando origem à hifa primária (Sato e Sato, 1982; Koch *et al.*, 1983). A célula epidérmica penetrada perde a organização celular e em 96 horas colapsa (Koch *et al.*, 1983; Yang 1991). O fungo cresce pelas células do mesófilo esponjoso e forma um haustório. Após essa etapa começa, então, a invasão do espaço intercelular, sendo produzidas hifas secundárias e haustórios adicionais. Após 192 horas da infecção, novos urediniosporos estão sendo formados e serão liberados pela ruptura da epiderme no nono dia, e a disseminação pode durar mais de quatro semanas (Koch *et al.*, 1983; Marchetti *et al.*, 1975).

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi aumentar o conhecimento a respeito das proteínas HyPRP de soja. Para tal, foi caracterizada a estruturação genômica dos genes que codificam HyPRPs em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e realizada a análise do padrão de expressão de quatro genes *HyPRP* (*Glyma14g14220*, *Glyma06g07070*, *Glyma04g6970* e *Glyma17g32100*) em resposta a diferentes estresses. Na tentativa de acessar o papel biológico das HyPRPs *in vivo*, o gene *Glyma14g14220* (*SbPRP*) foi adaptado a vetores para a transformação de plantas de soja, visando a superexpressão e silenciamento do mesmo.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados sob a forma de dois capítulos independentes, uma vez que se optou em investigar o papel dos genes que codificam proteínas pertencentes à família das HyPRPs de duas formas. No Capítulo I serão apresentados os resultados referentes à análise do padrão de expressão de três genes em plantas de soja, submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticos. No Capítulo II serão apresentados os resultados referentes à transformação de plantas de soja com um membro dessa família.

CAPÍTULO I

I.1. Introdução

A função da parede celular vegetal como barreira mecânica à invasão de patógenos é bem conhecida (Cassab, 1998). Entretanto, pouco se sabe sobre como a parede celular responde dinamicamente a mudanças externas, tais como um ataque fúngico ou uma condição de déficit hídrico.

Algumas proteínas de parede celular são capazes de responder rapidamente a ataques de patógenos, formando ligações cruzadas através de oxidação, reforçando, provavelmente, a barreira física. Esse processo ocorre com as glicoproteínas de parede celular: extensinas e proteínas ricas em prolina (PRP) (Showalter, 1993; Schnabelrauch, 1996).

Condições de seca também regulam a expressão de genes que codificam proteínas de parede celular, tais como proteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPS), pectina metil esterase e extensinas, todas relacionadas com organização, modificação e biogênese da parede celular (Molina *et al.*, 2008). Deutch e Winicov, em 1995, mostraram que a proteína codificada pelo gene *MsPRP2* (MsPRP2, da leguminosa *Medicago truncatula*) pertence à família de proteínas HyPRP (do inglês *Hybrid Proline Rich Protein*), e que, possivelmente, ela contribui para a tolerância da planta ao estresse salino.

Ainda assim, pouco se sabe a respeito do papel das HyPRPs na proteção da planta durante uma situação de déficit hídrico e como respondem a ataques de patógenos. A identificação de genes responsivos a esses estresses é uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a tolerância das cultivares aos desafios ambientais.

He e colaboradores, em 2002, mostraram que o gene *SbPRP* de soja, integrante da família das HyPRPs, responde à seca, ao estresse salino, a hormônios vegetais (como o ácido salicílico, AS), a infecções virais e é influenciado pelo ritmo circadiano. As HyPRPs são caracterizadas por serem compostas por um peptídio-sinal (SP), um domínio N-terminal direcionador à parede celular, um domínio rico em resíduos de prolina (PRD) e um domínio com 8 resíduos de cisteína conservados (8CM) (José *et al.*, 1994). Estas proteínas estão presentes nas plantas com sementes e, aparentemente, ausentes nas plantas sem sementes. Elas formam sempre grandes famílias, que apresentam desde 14 membros,

como em *Medicago truncatula*, até 52, como em *Zea mays* (Lenka *et al.*, 2007).

I.2. Objetivos

A fim de aumentar a compreensão a respeito do papel biológico da família gênica *HyPRP*, o presente trabalho teve como objetivo identificar e posicionar todos membros *HyPRP* presentes no genoma da soja e avaliar o padrão de expressão de quatro genes: *Glyma04g06970*, *Glyma06g07070*, *Glyma14g14220* (*SbPRP*) e *Glyma17g32100*, cujos produtos são formadores de um clado monofilético entre as *HyPRPs* de soja.

I.3. Material e Métodos

I.3.1. Ferramentas de bioinformática utilizadas

A ferramenta *on-line* tBlastN, disponível no sítio do projeto Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>), foi utilizada na busca de possíveis genes *HyPRP* no genoma da soja.

Para os alinhamentos gênicos foi utilizado o programa Mega 4.1 (Kumar *et al.*, 2008).

Para as filogenias foi utilizado o programa Paup (Swofford, 2001).

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foi utilizada a ferramenta *on-line* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Para análise dos domínios conservados foi utilizada a ferramenta InterProScan Sequence Search (EMBL-EBI).

I.3.2. Material vegetal utilizado nos tratamentos com ácido abscísico (ABA), cloreto de sódio (NaCl) e ácido salicílico (AS)

Sementes de soja da cultivar Conquista foram plantadas em copos plásticos (200 mL) contendo o substrato vermiculita e regadas com meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo metade da concentração predita pelos autores, com vistas a viabilizar seu desenvolvimento. As culturas foram mantidas durante todo o experimento à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, com intensidade luminosa de $22,5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Duas horas após o início do período de luz, plantas com duas semanas de idade foram colocadas em solução hidropônica, contendo meio MS com metade da força e separadas em dois grupos. Um grupo foi composto por plantas submetidas a determinado tratamento. Desse grupo, amostras de tecido radicular e foliar foram coletadas em tempos determinados. O outro grupo foi utilizado como controle, onde plantas não tratadas foram mantidas sob as mesmas condições de cultivo das plantas submetidas ao tratamento durante todo o experimento.

I.3.3. Tratamento com Ácido Abscísico (ABA)

ABA a uma concentração de 100 μ M, (Liao, *et al.*, 2008) foi adicionada à solução hidropônica, com vistas a mimetizar os efeitos de estresse abiótico nas plantas em estudo. No grupo composto pelas plantas controle, a solução hidropônica não teve o acréscimo do fitormônio. As amostras de tecido radicular e foliar foram coletadas seis horas após o início do tratamento.

I.3.4. Tratamento com cloreto de sódio (NaCl)

NaCl a uma concentração de 150 mM e de 75 mM foram adicionadas à solução hidropônica das plantas tratadas, enquanto que o grupo controle permaneceu no mesmo meio hidropônico, livre do agente estressor. Nesse experimento, as coletas de tecido radicular e foliar foram realizadas quando transcorridas seis horas do início do tratamento.

I.3.5. Tratamento com Ácido Salicílico (AS)

Uma concentração de 2 mM de AS foi adicionada à solução hidropônica (meio MS com metade da força), a qual foi aspergida nas folhas (início da manhã e final do fotoperíodo, momento em que os estômatos encontram-se mais abertos) de plantas jovens de soja por um período de 48 h. Posteriormente, ocorreu a coleta das amostras de tecido foliar para extração de RNA e síntese de cDNA.

I.3.6. Infecção por *Phakopsora pachyrhizi*

O experimento de infecção por *P. pachyrhizi* foi realizado em abril de 2009, na sede da Embrapa Soja (Londrina, PR). Plantas de soja da cultivar Embrapa - 48 (genótipo suscetível) e da linhagem PI 561356 (acesso resistente) foram semeadas em casa de

vegetação - seis vasos para cada genótipo, três plantas por vaso. Três semanas após o início do cultivo, realizou-se a inoculação com o patógeno: urediniosporos foram coletados e suspensos em água contendo gotas de Tween-20, para uma concentração final de $2,6 \times 10^4$ esporos mL^{-1} . A solução foi borrifada nas folhas de metade das plantas de cada genótipo, sendo a outra metade utilizada como controle. A inoculação ocorreu após as 18 h - à noite a umidade é maior, facilitando o processo de infecção pelo fungo - e as plantas inoculadas permaneceram por 12 h cobertas por plástico. Trifólios foram coletados 1, 12, 24, 48, 96 e 192 h após a inoculação (hpi), sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA.

I.3.7. Extração de RNA total

Amostras de tecido radicular e foliar de plantas de soja foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas em morteiro. Aproximadamente 100 mg do tecido macerado foi homogeneizado em um mL de Trizol (Invitrogen) , em microtubo. Posteriormente, essas amostras foram incubadas durante cinco minutos à temperatura entre 15°C e 30°C , com vistas a permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio para cada um mL de Trizol usado inicialmente. Após vigorosa agitação com duração de 15 segundos, os tubos de microcentrífuga contendo as amostras homogeneizadas foram novamente incubados por um período de dois a três minutos à temperatura entre 15°C e 30°C . Ao término, essas amostras foram dispostas em uma centrífuga refrigerada (4°C) e submetidas a um processo de centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos. Este procedimento possibilita a separação de fases. O RNA, presente na fase aquosa, foi coletado e transferido para um novo tubo onde foram adicionados 500 μL de isopropanol para cada mL de Trizol empregado no início da extração. Após 10 minutos de incubação em temperatura entre 15°C e 30°C , as amostras foram novamente centrifugadas durante 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA lavado com um mL de etanol 70% para cada mL de Trizol empregado no início do processo. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o RNA permaneceu em temperatura ambiente até a total evaporação do álcool. Por fim, o RNA foi suspenso em 30 μL de água MilliQ autoclavada.

I.3.8. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Invitrogen ou Promega), de acordo com instrução dos fabricantes, sendo que em ambos os casos o volume final da reação foi de 50 µL. A solução-estoque foi preparada diluindo dez vezes o cDNA obtido. Para as PCRs quantitativas em tempo real (qPCR), a solução-estoque de cDNA foi diluída mais dez vezes (diluição final 1:100).

I.3.9. PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As análises de qPCR foram realizadas no aparelho “StepOnePlus™ Real-Time PCR System”, da Applied Biosystems. As qPCRs foram compostas de um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 10 s a 94°C, 15 s a 60°C e 15 s a 72°C. As amostras foram mantidas por 2 min a 40°C para reanelamento e, então, aquecidas de 55°C a 99°C para a aquisição dos dados relativos à curva de desnaturação do produto de amplificação.

As qPCRs foram feitas usando 12,5 µL da amostra de cDNA diluído (1:100), 2,0 µL de tampão PCR 10 X [Tris/HCL a 100 mM, (pH 8,0), KCl a 500 mM], 1,2 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,1 µL de dNTPs a 5 mM, 0,2 µL de cada *primer* 10 µM, 7 µL de água, 2,0 µL de SYBR-Green (1:100.000), e 0,05 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U µL⁻¹; Invitrogen). O volume final da reação por tubo foi de 25 µL. Os *primers* utilizados nas reações estão listados na Tabela I.1. Todas as reações foram realizadas com quadruplicatas técnicas e quadruplicatas biológicas. Uma exceção ocorreu com o experimento realizado na Embrapa Soja de Londrina (ferrugem asiática), no qual foram utilizadas somente três amostras biológicas (sem *pool* de plantas). O cálculo foi feito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Como normalizadores internos da reação foram utilizadas quatro sequências gênicas: fator de alongação alfa-2 (*elfII*), *F-box*, *Metalloprotease* e *cyp* (Libault *et al.*, 2008). Empregou-se o teste T de Student (Microsoft® Office Excel 2007), a um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), com vistas a validar as variações observadas nos tratamentos.

I.3.10. Projeção de Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos específicos para os genes *Glyma04g06970*, *Glyma06g07070*, *Glyma14g14220* (*SbPRP*) e *Glyma17g32100* foram projetados com base nas sequências

depositadas no Phytozome. A ferramenta *on-line* Primer3 foi empregada para predição das sequências dos oligonucleotídeos mais adequados. Os locais de anelamento foram precisamente escolhidos de modo que não amplificassem outros genes *HyPRP* não alvo das análises. As sequências dos oligonucleotídeos estão mostradas na Tabela I.1

Tabela I.1: Oligonucleotídeos específicos para os genes *Glyma04g06970*, *Glyma06g07070*, *Glyma14g14220* (*SbPRP*) e *Glyma17g32100* utilizados nos experimentos de qPCR. As sequências foram preditas através da ferramenta *on-line* Primer3.

Gene	Amplicon	Temperatura de anelamento (°C)	Sequências (5'-3') Oligonucleotídeos
<i>Glyma04g06970</i>	239	60,20 – 59,90	FOR: GTCCTCCTCCTTCTCCTCCTT REV: GAGCGTCACAGGTACGTTCA
<i>Glyma06g07070</i>	232	60,32 – 59,84	FOR: TCCACCTTCTCCTCCGAAG REV: CGAAGGAGGAGTTCCAACAG
<i>Glyma14g14220</i> (<i>SbPRP</i>)	160	60,29 – 59,67	FOR: AAAACTGTTTCTGCTGGCTT REV: TAAGGCAAACACGTGTTTACCTAG
<i>Glyma17g32100</i>	173	60,5 – 59,39	FOR: GAAGGTTTGGCTGATTTGGA REV: AATGAACCTAACATGATGGAAGC

I.4. Resultados e Discussão

I.4.1. Identificação dos parálogos do gene *SbPRP*

Com base na sequência de resíduos de aminoácidos do gene *SbPRP*, descrito por He e colaboradores em 2002, foi feita uma busca apurada por outros membros *HyPRP* no banco de dados Phytozome. Utilizando a ferramenta tBlastN foram encontrados os possíveis parálogos do gene *SbPRP* no genoma da soja (Fig. I.1). Um total de 45 sequências foram identificadas em 11 cromossomos. O número de sequências encontradas em cada cromossomo foram:

- Cromossomo I= uma sequência;
- Cromossomo IV=uma sequência;
- Cromossomo V= dez sequências;
- Cromossomo VI= uma sequências;
- Cromossomo IX= três sequências;
- Cromossomo X= uma sequências;
- Cromossomo XIII= duas sequências;

Cromossomo XIV= uma seqüências;

Cromossomo XV= dez seqüências;

Cromossomo XVII= 12 seqüências;

Cromossomo XX= três seqüências.

As seqüências gênicas foram compiladas em arquivo “.doc” para as análises.

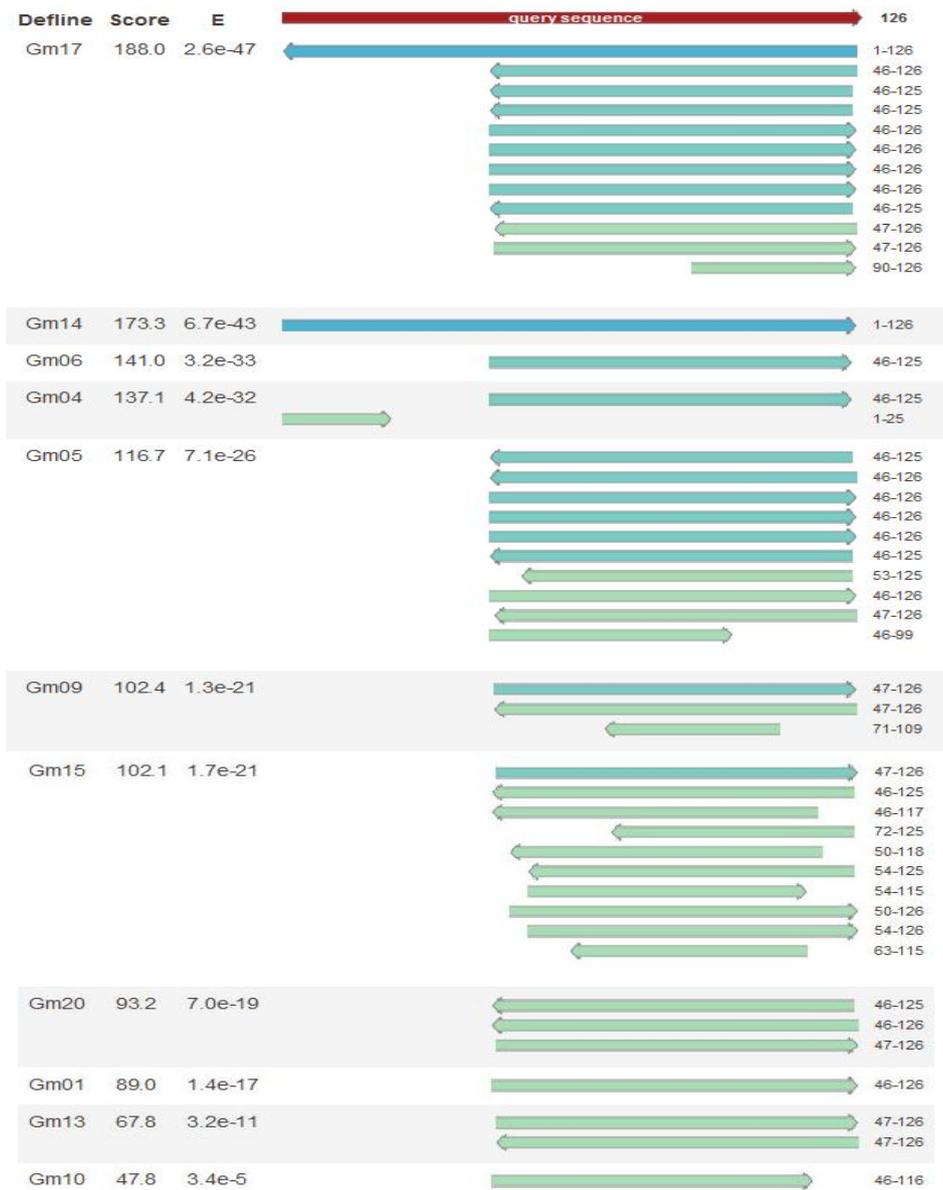


Figura I.1: Resultado não curado obtido com a ferramenta tBlastN na busca por parálogos do gene *SbPRP* no genoma da soja depositado no banco de dados Phytozome. Foi utilizada a sequência de resíduos de aminoácidos da proteína *SbPRP* como isca (*query*), representada pela barra vermelha. Na figura, Gm corresponde ao número do cromossomo e as barras coloridas em tons de verde representam as sequências similares com *SbPRP*, em cada cromossomo da soja. “Score” corresponde a medida de similaridade entre a isca e a sequência mostrada. “E” corresponde a probabilidade de haver outro alinhamento com “score” maior do que o atual. A numeração à direita, ao lado de cada barra, delimita a porção de aminoácidos similares entre *SbPRP* e demais sequências.

A partir da tradução das sequências nucleotídicas, foi possível fazer uma triagem criteriosa com base nos resíduos de aminoácidos. Foi realizada uma análise independente para cada sequência proteica em busca da presença ou ausência dos domínios (SP, PRD e 8CM) que caracterizam as HyPRPs. Para tal, foi empregada a ferramenta InterProScan Sequence Search (EMBL-EBI).

A fim de avaliar acuradamente se as sequências de resíduos de aminoácido similares a SbPRP realmente correspondiam a uma HyPRP, o domínio 8CM, mais conservado e característico das HyPRP, recebeu atenção especial, sendo a sua presença critério definitivo para inclusão ou exclusão da sequência candidata como uma HyPRP verdadeira. A presença conservada da região que codifica o domínio 8CM foi confirmada em 35 genes *HyPRP* no genoma da soja. Os 35 membros *HyPRP* são todos transcritos, dado confirmado no banco de dados *Soybean Full-Length cDNA Database*. A Figura I.2 mostra o alinhamento feito no programa Mega 4.1, que se baseia no algoritmo do programa ClustalW, ressaltando os domínios presentes nas HyPRPs.

Dez sequências de genes *HyPRP* foram excluídas da análise devido aos seguintes motivos: (1) não possuem o domínio 8CM conservado; (2) apresentarem códons de terminação em diversos sítios, interrompendo a respectiva proteína; (3) apresentarem domínios não característicos, como foi o caso de duas Proteínas Ricas em Glicina, que no lugar do domínio PRD, apresentaram um domínio rico em glicinas; (4) não possuem o domínio SP ou o domínio PRP.

O grande número de HyPRPs encontradas no genoma da soja é uma situação comum no genoma de outros organismos. Lenka e colaboradores (2007) encontraram 19 HyPRPs no genoma do tomate, 52 no genoma do milho, 21 no de *Pinus taeda* e 14 no genoma de *Medicago truncatula*. Outras glicoproteínas de parede celular, como as expansinas-A, apresentam 26 membros em *Arabidopsis thaliana*, 27 membros em *Populus sp.* e 34 membros em *Oryza sativa* (Sampedro *et al.*, 2005). Assim, o grande número de HyPRPs (35) encontradas no genoma de soja está dentro do esperado para glicoproteínas de parede celular.

I.4.2. Posicionamento cromossômico dos genes *HyPRP*

A soja possui um genoma composto de 950 megabases, sendo 57% representado por DNA repetitivo (Schmutz *et al.*, 2010). Segundo Schlueter e colaboradores (2004), a soja sofreu dois eventos de poliploidização: um há 45 milhões de anos e outro há 14 milhões de anos, sendo, assim, considerada um paleopoliploide. Devido ao longo tempo transcorrido após as poliploidizações, os cromossomos divergiram muito em suas sequências, sendo difícil a identificação de pares homólogos (Walling *et al.*, 2006).

Uma vez curados os resultados de busca das HyPRPs no genoma da soja, os 35 genes obtidos foram posicionados entre os 20 cromossomos da soja (Fig. I.3).

A presença dos genes *HyPRP* amplamente distribuídos nos cromossomos da soja e sua recorrente organização em tandem (genes nos cromossomos V, XV e XVII) é, também, uma estrutura recorrente entre os genes que codificam glicoproteínas de parede celular. Sampedro e colaboradores (2005) verificaram, nos genomas do arroz e de *A. Thaliana*, uma ampla distribuição desses genes entre os cromossomos e também a organização deles em tandem.

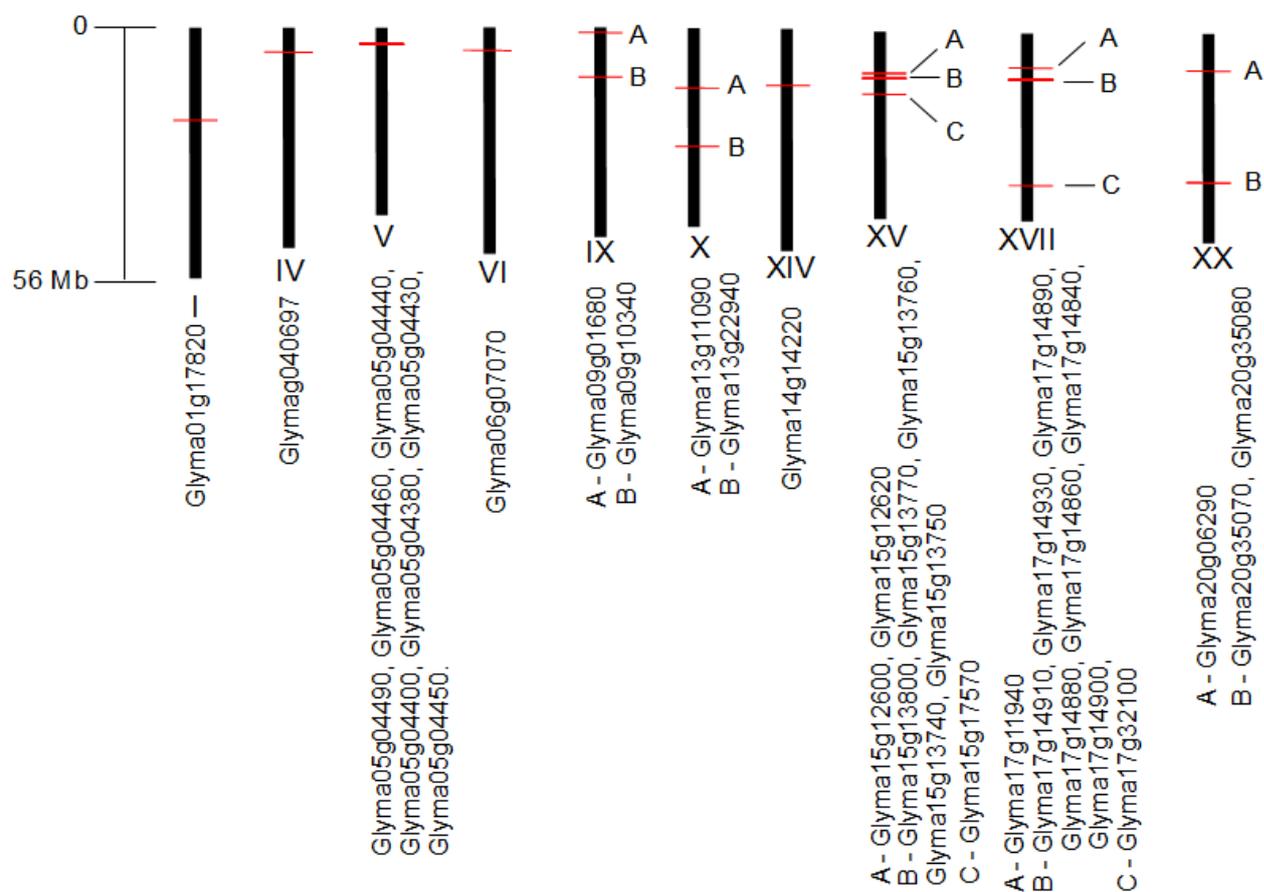


Figura I.3: Posição dos 35 genes *HyPRP*, distribuídos em 10 cromossomos da soja. A barra vermelha indica a posição de cada gene ou tandem gênico ao longo de cada cromossomo. Números romanos indicam o número do cromossomo. A nomenclatura dos genes corresponde ao seu ordenamento em cada cromossomo. Assim, Glymaxxg####, onde xx representa o número do cromossomo e #### sua posição ao longo do mesmo.

I.4.3. Filogenia das HyPRPs de soja

Os domínios presentes na porção amino-terminal das HyPRPs são altamente variáveis em relação ao tamanho, composição de aminoácidos e motivos de sequências repetitivas (principalmente o domínio PRP), dificultando inferências filogenéticas. Já o domínio presente na porção carbóxi-terminal (8CM) é conservado o suficiente para serem feitas análises filogenéticas. Mesmo assim, devido ao seu pequeno tamanho (de ≈ 86 aa),

baixos valores de *bootstrap* são obtidos em vários nós. Essa estruturação também ocorre em outras espécies, tais como *O. sativa* e *Z. mays* (Lenka *et al.*, 2007).

No presente trabalho, duas árvores filogenéticas (Fig. I.4) foram construídas com base nos 35 genes *HyPRP* de soja. Foram utilizadas as sequências nucleotídicas correspondentes a uma região mais conservada do domínio SP (indicada na Figura I.2A) e ao domínio 8CM inteiro. Por meio do programa Paup, foi gerada uma árvore filogenética consensual usando o método de *Máxima Parsimônia* e, com o programa Mega, outra pelo método de *Neighbor-joining*.

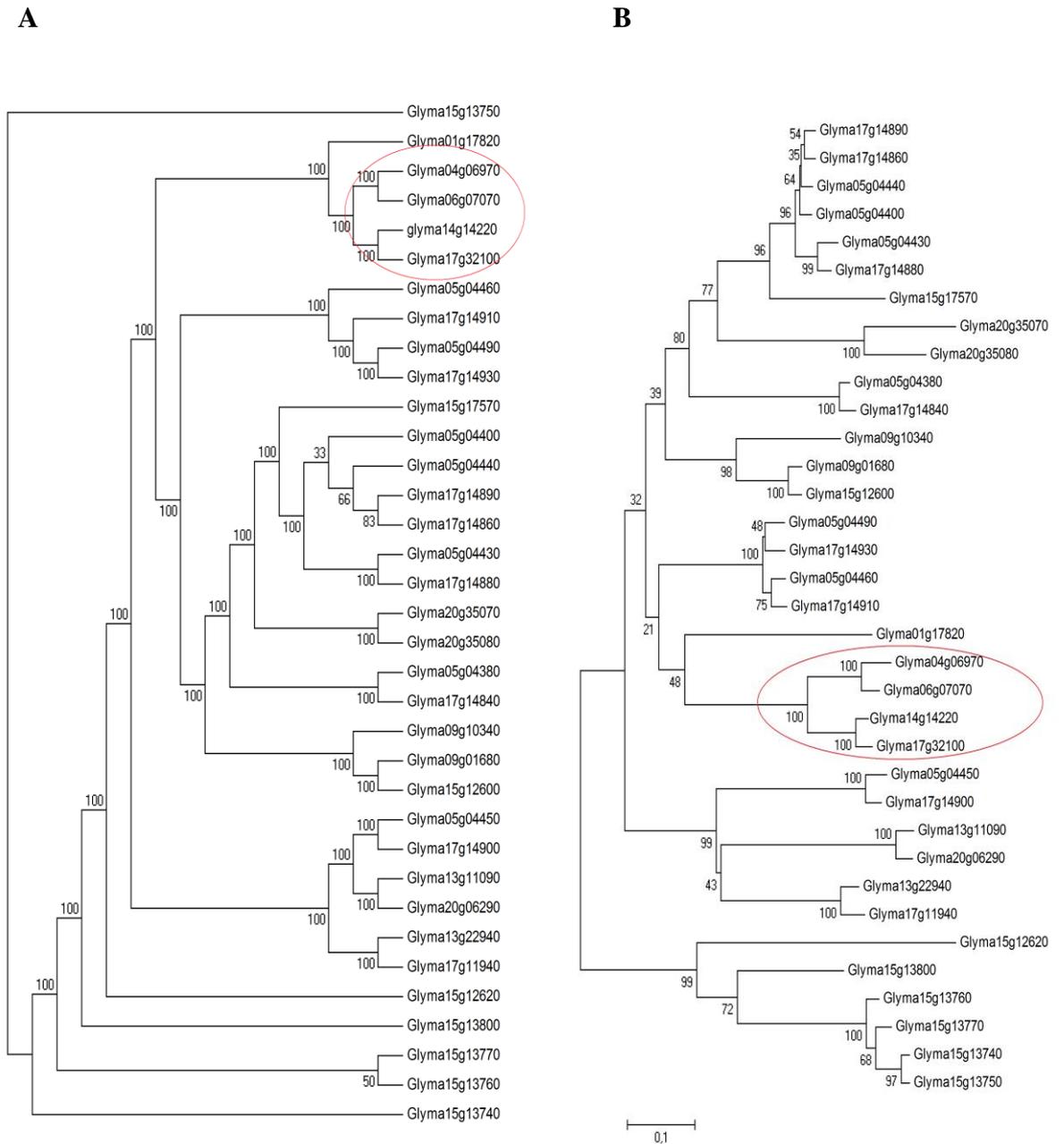


Figura I.4: Árvores filogenéticas não enraizadas obtidas com emprego dos programas Mega e Paup e construídas a partir do alinhamento de regiões conservadas das sequências nucleotídicas dos 35 membros de genes *HyPRP* de soja. A parte **A** mostra a árvore consenso gerada pelo método de *Máxima Parsimônia* em Paup. Em **B** a árvore filogenética foi gerada pelo método de *Neighbor-joining* no programa Mega. Em ambas as árvores foram utilizadas uma porção mais conservada do domínio SP e o domínio 8CM inteiro. Na árvore A, os números nos nós indicam quantas vezes o ramo agrupou-se como o mostrado, e na árvore B, os números nos nós indicam o *bootstrap* obtido com 1.000 repetições. Circulado em vermelho está o clado monofilético ao qual pertence o gene *SbPRP* (*Glyma14g14220*).

O maior interesse dos autores com esse trabalho foi o de averiguar como estavam estabelecidas as relações evolutivas entre o gene *SbPRP* (*Glyma14g14220*) e os demais genes *HyPRP*. Após a construção das árvores filogenéticas com todos os genes *HyPRP* de soja, verificou-se que o gene *SbPRP*, caracterizado por He e colaboradores em 2002, faz parte de um clado bem sustentado e composto por mais três membros: *Glyma04g06970*, *Glyma06g07070* e *Glyma17g32100* (indicados na Figura I.4). O gene *SbPRP* é mais próximo evolutivamente do gene *Glyma17g32100*, e os genes *Glyma04g06970*, *Glyma06g07070* são mais próximos entre si.

Entre as sequências dos produtos dos genes *Glyma04g06970* e *Glyma06g07070* (*Glyma04g06970* e *Glyma06g07070*, Fig. I.5), a porção amino-terminal, correspondente ao SP, mostra-se bastante conservada, ocorrendo somente uma troca de aminoácidos na posição 17: um resíduo de fenilalanina foi substituído por um de serina. Já a porção correspondente ao domínio central, PRD, é extremamente variável em relação ao tamanho, composição de aminoácidos e motivos de sequências repetitivas. A região compreendida entre a posição 99 até 111 da proteína *Glyma06g07070* parece ter sido gerada por uma duplicação da sequência PPTPKTPPTPTPTP (indicada por um retângulo vermelho na Figura I.5), uma vez que essa região está presente somente uma vez na proteína *Glyma04g06970*. Em relação à porção carboxi-terminal, composta pelo domínio 8CM, pouquíssimas substituições foram encontradas entre *Glyma04g06970* e *Glyma06g07070*. Na posição 158 da sequência de resíduos de aminoácidos ocorreu a substituição de um resíduo de treonina por um de isoleucina; na posição 166 ocorreu a substituição de um resíduo de glutamato por um de glutamina e na posição 189 um resíduo de serina foi substituído por um de alanina. As posições foram indicadas baseando-se na sequência mais longa, da proteína *Glyma06g07070*.

Entre as sequências *Glyma14g14220*, que corresponde ao gene *SbPRP*, e a sequência *Glyma17g32100* (Fig. I.5) não ocorreram substituições, tanto no domínio SP como no domínio PRD. Essas duas proteínas podem ser diferenciadas somente pelas alterações acumuladas no domínio 8CM. Na posição 133 ocorreu a substituição de um resíduo de serina por um resíduo de leucina e na posição 121 ocorreu a substituição de um resíduo de serina por um de alanina. Ambas as proteínas apresentam o mesmo número de aminoácidos.

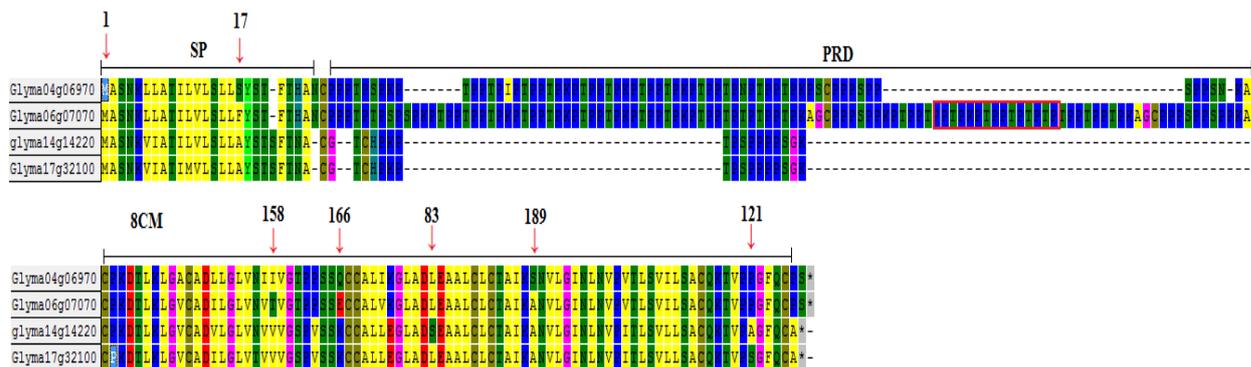


Figura I.5: Resultado do alinhamento das seqüências de resíduos de aa das proteínas Glyma04g06970, Glyma06g07070, Glyma14g14220 e Glyma17g32100, feito através do programa MEGA 4.1. Domínios SP, PRD e 8CM indicados na parte superior da figura. Retângulo vermelho indica região gerada, provavelmente por duplicação, e setas indicam as posições dos resíduos de aminoácidos.

I.4.4. Análise do padrão de expressão de quatro genes da família *HyPRP* em soja

Com o objetivo de compreender um pouco mais a respeito da expressão dos genes da família *HyPRP* em soja, quatro experimentos foram delineados. Nestes experimentos, as plantas de soja foram submetidas a condições de alta salinidade, presença de ABA ou de AS e submetidas à inoculação com o fungo causador da doença ferrugem asiática (*Phakopsora pachirizi*). He e colaboradores, em 2002, avaliaram a expressão do gene *SbPRP* (agora denominado *Glyma14g14220*) em diversas condições, tais como: seca; estresse salino; estímulo por hormônios vegetais, como a presença de ácido salicílico, e infecção viral. No entanto, naquele trabalho, o padrão de expressão gênica foi examinado pela hibridização com a técnica de *Northern-blot*, a qual é menos sensível do que análises por qPCR. No presente trabalho, quatro genes que codificam proteínas pertencentes à família *HyPRP* foram escolhidos para serem analisados em folhas e raízes de plantas de soja submetidas aos tratamentos já citados através de qPCR, são eles: *Glyma17g32100*, *Glyma14g14220*, *Glyma06g07070* e *Glyma04g6970*. Tais genes são formadores do clado monofilético (indicado na Figura I.4) ao qual pertence o gene *SbPRP*, estudado por He e colaboradores (2002). A expressão do gene *Glyma06g07070* não foi detectada. Isso ocorreu em todos os experimentos de qPCR. Apesar de diversos oligonucleotídeos terem sido projetados para este gene, ele continuou não sendo detectado nos experimentos de

qPCR realizados. No banco de dados *Soybean Full-Length cDNA Database* está depositada a sequência de cDNA relativa ao gene *Glyma06g07070*, sintetizada a partir da extração de RNA total de folha, raiz e caule homogenizados, o que indica que ele é expresso, mesmo não tendo sido possível detectá-lo. Transcritos relativos aos demais genes foram detectados com sucesso e os resultados serão discutidos nos próximos itens.

I.4.4.1. Análises da expressão dos genes *HyPRP* em resposta ao fitormônio ABA

Plantas jovens de soja foram submetidas ao tratamento com 150 μ M de ABA e, após 6 h de estresse, amostras de tecido radicular e foliar foram coletadas e o RNA foi extraído. Apesar de He e colaboradores, em 2002, não terem conseguido verificar resposta do gene *SbPRP* a ABA, as análises por qPCR (Fig. I.6) permitiram observar um aumento significativo do nível de expressão nas folhas para os genes *Glyma14g14220* (*SbPRP*), *Glyma17g32100* e *Glyma04g06970*. Apesar de o gene *Glyma14g14220* ter sido o menos expresso na situação controle, esse gene foi o que teve o maior nível de indução, sendo esta de aproximadamente 32 vezes em resposta ao ABA, em relação à situação controle. Já os genes *Glyma04g06970* e *Glyma17g32100*, basalmente mais expressos na situação controle, tiveram um aumento na expressão após o tratamento com o hormônio de quatro e sete vezes, respectivamente. Para as amostras de raiz nenhum dos genes respondeu ao tratamento, não sendo detectada a expressão destes genes nem nos cDNAs obtidos a partir das plantas controle.

A discrepância entre os resultados obtidos no presente trabalho e os obtidos por He e colaboradores (2002) poderia ser atribuída principalmente ao fato de que no trabalho dos últimos a expressão dos genes foi analisada pela técnica de *northern-blot*, a qual é bem menos sensível na detecção de transcritos do que a qPCR.

O ABA é um hormônio vegetal classicamente envolvido com a resposta a estresse abiótico, em especial à seca (Schroeder *et al.*, 2001; Assmann, 2003; Yamaguchi e Shinozaki, 2006). Além disso, Gimeno-Gilles e colaboradores, em 2009, mostraram que esse hormônio vegetal é capaz de inibir fortemente a germinação de embriões da leguminosa *M. truncatula*, pela inibição de glicoproteínas envolvidas na arquitetura e biossíntese da parede celular, tais como expansinas-A e extensinas. Estas proteínas também estão localizadas na parede celular, assim como as HyPRP, sendo que as extensinas

compartilham o domínio PRP com as HyPRPs.

Um total de 496 genes sobrepõem seus padrões de expressão frente à presença de ABA e à condição de seca. No entanto, muitos genes, especialmente aqueles que codificam proteínas de parede celular, tais como xiloglicano-endo-transglicosilases e glicosil-hidrolases-1, são induzidos por ABA, mas reprimidos por seca. Isso ocorre, provavelmente, por que tais proteínas estão envolvidas com a expansão da parede celular, que é interrompida com a perda de turgor na célula causada pela falta de água (Nemhauser *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008).

Sendo o gene *SbPRP* induzido por seca (He *et al.*, 2002) e por ABA, como mostrado no presente trabalho, possivelmente as HyPRPs estejam mais envolvidas com a organização e não diretamente com a expansão da parede celular. Assim, em condições de seca, poderiam estar executando um papel organizador da parede celular e, talvez, protetor celular. As glicoproteínas extensinas HRGP, que também possuem um domínio rico em prolinas, estão envolvidas na auto-organização da parede celular, fazendo a ligação cruzada entre os polímeros de pectina (Cannon *et al.*, 2008). Em um mutante nulo de *A. thaliana* para a HRGP ocorre a mal formação dos embriões (Hall, *et al.*, 2002). Assim como as HRGPs, as HyPRPs também poderiam estar envolvidas com a organização da parede celular, até mesmo perante o déficit hídrico.

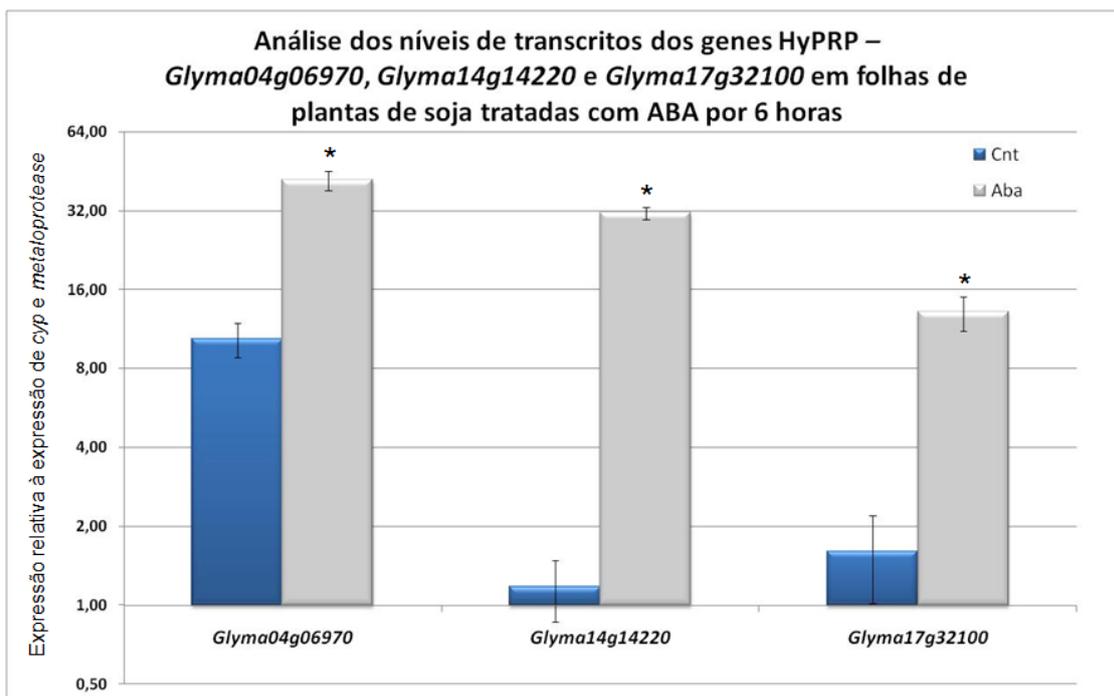


Figura I.6: Determinação do nível de expressão dos genes *Glyma14g14220* (*SbPRP*), *Glyma17g32100* e *Glyma04g06970* de soja em resposta ao tratamento com ABA. O RNA total das folhas foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qPCR. As folhas foram coletadas após 6 h de tratamento com 150 μ M de ABA. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *cypI* e *metaloprotease*. A normalização dos resultados foi feita em relação à média da expressão relativa do gene *Glyma14g14220* em plantas controle. Barras em azul representam plantas controle não tratadas com ABA e barras em cinza representam plantas tratadas com ABA. Asteriscos representam tratamentos com resposta estatisticamente significativa, segundo o teste T de Student.

I.4.4.2. Análises da expressão dos genes *HyPRP* em resposta a AS

No trabalho de He e colaboradores, em 2002, foi observado um aumento da expressão do gene *SbPRP* em folhas e caules de soja perante diversos tratamentos com ácido salicílico, tais como a imersão de plântulas em diferentes concentrações de ácido salicílico ou a imersão somente das raízes de plantas jovens em ácido salicílico com simultânea aspersão das folhas.

No presente trabalho, plantas jovens de soja foram submetidas ao tratamento com 2 mM de AS por 48 h. Amostras de tecido radicular e foliar foram coletadas. não foi

verificada variação significativa na expressão dos genes *Glyma14g14220* (*SbPRP*), *Glyma17g32100* e *Glyma04g06970* em folhas de soja entre plantas tratadas e plantas controle após 48 h de tratamento (Fig. I.7A).

A discrepância dos resultados em relação à variação do padrão de expressão dos genes *Glyma14g14220* (*SbPRP*), *Glyma17g32100* e *Glyma04g06970* em tecido foliar após tratamento com AS entre os dois trabalhos (esse e o de He e colaboradores) pode ser consequência dos diferentes protocolos empregados. No presente trabalho, a simples aspersão das folhas com solução contendo AS pode não ter proporcionado tempo suficiente de interação do AS com as folhas para assim estimular a resposta dos genes. A favor dessa hipótese existe o fato de que dois genes foram induzidos em raízes talvez devido ao fato de que as mesmas receberam tratamento muito mais prolongado por terem ficado imersas em solução MS, a uma concentração de 2 mM de AS, adicionada aos copos plásticos onde as plantas estavam. He e colaboradores (2002), por sua vez, não detectaram a presença de transcritos do gene *SbPRP* em raízes de soja. No presente trabalho foi possível detectar, nas raízes das plantas de soja, a presença da expressão dos três genes estudados (Fig. I.7B), sendo que os genes *Glyma14g1422* e *Glyma17g32100* foram induzidos de maneira significativa, em relação às plantas controle. O fato de He e colaboradores (2002) terem, novamente, utilizado a técnica *northern-blot*, pouco sensível em comparação à técnica de q-PCR, poderia justificar a não detecção de transcritos de *SbPRP* na raiz.

O gene *Glyma14g14220* foi, novamente, o menos expresso na situação controle, tanto para tecido radicular como foliar. Como visto anteriormente, para o tratamento com ABA, o gene mais induzido foi o gene *Glyma14g14220*. Já para o tratamento com AS, o gene mais induzido foi *Glyma17g32100*. O gene *Glyma04g06970* foi o mais expresso nas plantas controle, tanto em tecido foliar do experimento com ABA, como em tecido radicular do experimento com AS. Devido à variação biológica, o gene *Glyma04g06970* não se manteve como o mais expresso na situação controle para tecido foliar nas plantas usadas como controle para o experimento com AS.

Dentre as respostas de defesa contra a invasão de patógenos, o AS é um importante sinalizador para a resposta mediada por genes R de resistência (ETI, do inglês *effector-triggered immunity*) (Dempsey *et al.*, 1999), cuja manifestação mais visível é a resposta hipersensitiva. Essa resposta atua pelo acúmulo localizado de espécies reativas de oxigênio, necrosando a área atacada pelo patógeno e bloqueando a sua invasão. O aumento

na presença de espécies reativas de oxigênio pode ativar a formação de ligações cruzadas e a lignificação da parede celular, dificultando a progressão do patógeno (Vlot *et al.*, 2009). El-Gendy e colaboradores (2001) verificaram que as proteínas GSRPs (do inglês, *glycine- and serine-rich proteins*) sofrem rápida deposição na parede celular em resposta a elicitores de *Fusarium graminearum* e são dependentes da presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Bradley e colaboradores (1992) também mostraram que PRPs sofrem rápida insolubilização e promovem a formação de ligações cruzadas mediadas por oxidação por H₂O₂ após tratamento com elicitador fúngico de células de soja. Para as HyPRPs não há descrição da formação de ligações cruzadas em resposta a patógenos, mas a resposta ao AS, mostrada em raízes no presente trabalho e em folhas por He e colaboradores em 2002, é um indicativo de que possam ser responsivas a estresses bióticos.

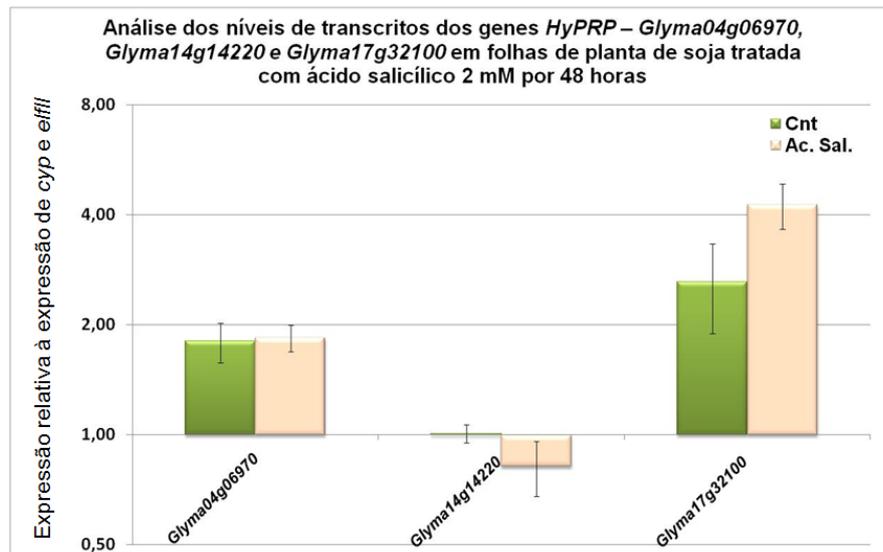
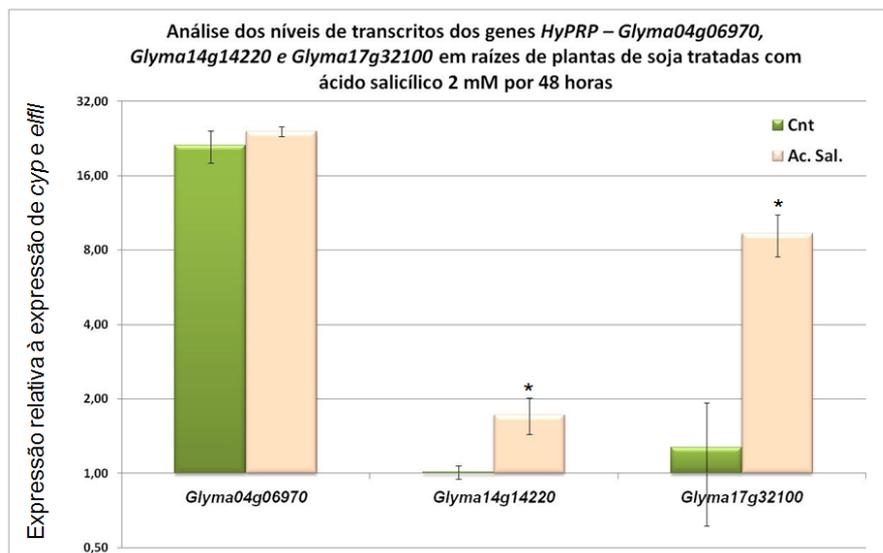
A**B**

Figura I.7: Determinação do nível de expressão dos genes *Glyma14g14220* (*SbPRP*), *Glyma17g32100* e *Glyma04g06970* em (A) folhas e (B) raízes de soja em resposta ao tratamento com AS. O RNA total das folhas e raízes de soja foram utilizados para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qPCR. As folhas e raízes foram coletadas após 48 h de tratamento com 2 mM de ácido salicílico. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *cyp* e *elfl*. A normalização dos resultados foi feita em relação à média da expressão relativa do gene *Glyma14g14220* em plantas controle. A expressão dos genes controle em folhas é três vezes maior do que em raízes. Barras verdes representam plantas controle não tratadas e barras em rosa representam plantas tratadas com ácido salicílico. Asteriscos representam tratamentos com resposta estatisticamente significativa segundo o teste T de Student.

I.4.4.3 Análises da expressão dos genes HyPRP em resposta ao cloreto de sódio

He e colaboradores, em 2002, mostraram que o gene *SbPRP* é reprimido após tratamento com 150 mM de NaCl. Essa concentração, no entanto, é muito tóxica para a planta. No presente trabalho, resultados semelhantes aos de He e colaboradores foram obtidos para a expressão dos genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100* em folhas de soja, que também foram reprimidos em relação aos padrões de expressão nas plantas controle (Fig. I.8). Para o gene *Glyma04g06970*, não houve repressão significativa nas folhas de plantas tratadas em relação às plantas controle.

Assim como nos tratamentos com ABA (folha) e AS (raiz), o gene *Glyma04g06970* manteve-se como o de maior expressão basal em folhas de plantas utilizadas como controle no experimento com NaCl. O gene *Glyma14g14220* apresentou, novamente, a menor expressão basal nas plantas controle. No entanto, nas plantas tratadas, sua expressão comportou-se de maneira antagônica ao experimento com ABA, onde, ao invés de ter sido induzido, foi reprimido em torno de 16 vezes em relação ao controle. O tratamento com uma concentração menos tóxica de NaCl (75 mM), capaz de induzir a expressão de *SbPRP* (He *et al.*, 2002), apresentou muita variação entre os controles, impossibilitando qualquer inferência (resultado não mostrado).

Nenhum transcrito relativo aos genes *Glyma04g06970*, *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100* pode ser detectado em tecidos radiculares tanto de plantas tratadas com 150 mM de NaCl como de plantas controle (resultado não mostrado). He e colaboradores (2002), também não conseguiram detectar a presença de transcritos de *SbPRP* em tecidos radiculares tratados com 2% de NaCl como em tecidos não tratados.

Apesar de a expansão celular cessar quando não há um turgor mínimo necessário, vários genes envolvidos na organização e biogênese da parede celular são induzidos durante a seca. Provavelmente, esses genes executam, neste momento, um papel reorganizador da parede celular. Molina e colaboradores (2008), por meio de experimento de *sage-display*, mostraram que alguns genes de parede celular, como os de uma extensina e de uma putativa PRP, são induzidos em raízes de grão de bico (*Cicer arietinum*) durante o déficit hídrico. No entanto, no mesmo trabalho, outros genes de parede celular foram reprimidos, tais com o do codificador de uma HRGPs e de uma pectina metil-esterase.

Ainda que estudos mais aprofundados devam ser realizados para uma melhor compreensão do papel das HyPRPs, os resultados da análise do padrão de expressão dos

três membros *HyPRP* em soja, permitiram confirmar que são responsivos ao déficit hídrico provocado pelo excesso de sal.

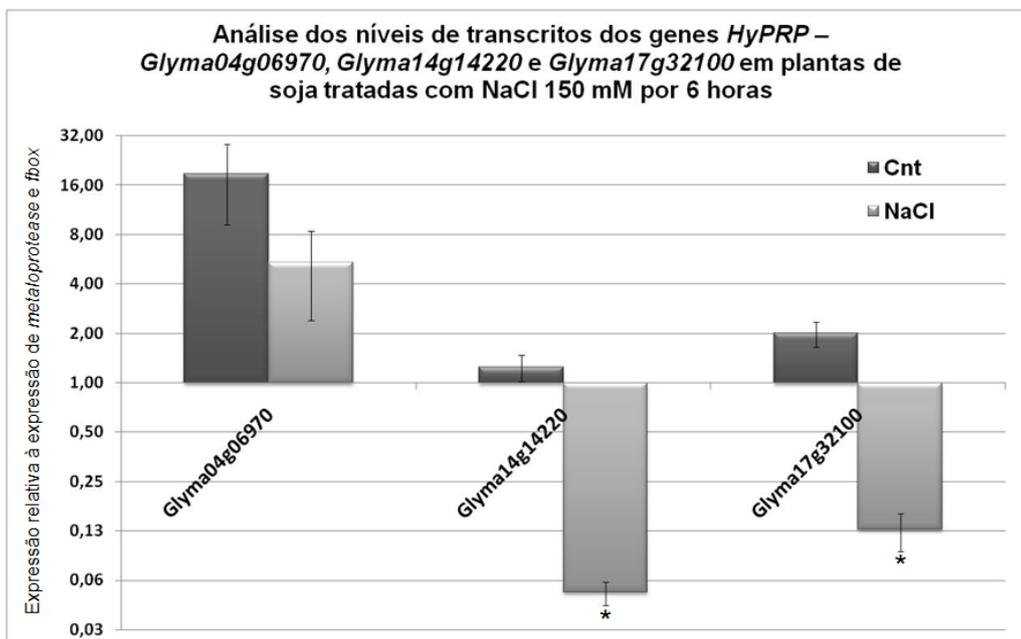


Figura I.8: Determinação do nível de expressão dos genes *Glyma14g14220* (*SbPRP*), *Glyma17g32100* e *Glyma04g06970* em folhas de soja em resposta ao tratamento com 150 mM de NaCl por 6 h. O RNA total das folhas de soja foi utilizado para a síntese de cDNA e as análises foram realizadas usando qPCR. As folhas foram coletadas após 6 h de tratamento com 150 mM de NaCl. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *metaloprotease* e *fbox*. A normalização dos resultados foi feita em relação à média da expressão relativa do gene *Glyma14g14220* em plantas controle. Barras em cinza escuro representam plantas controle não tratadas com NaCl e barras em cinza claro representam plantas tratadas com NaCl. Asteriscos representam tratamentos com resposta estatisticamente significativa segundo o teste T de Student.

I.4.4.4. Experimento com o fungo causador da doença Ferrugem Asiática

Uma cinética de indução bimodal dos genes *Glyma04g06970*, *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100* pode ser observada por qPCR no genótipo Embrapa-48 (genótipo suscetível à ferrugem asiática) (Figs. I.9, I.10 e I.11, respectivamente).

Uma hora após o inóculo dos urediniósporos de *P. pachirizi*, estágio que corresponde à formação do tubo de germinação, observou-se que para o genótipo

suscetível a expressão dos três genes (Figs. I.9A, I.10A e I.11A) mostrou-se reprimida nas plantas inoculadas em relação às plantas controle não inoculadas. Já para o acesso resistente ocorreu o contrário para a expressão dos genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100*, que foi aumentada nas plantas inoculadas, em relação às plantas controle (Figs. I.10B e I.11B, respectivamente). Os genes *Glyma17g32100* e *Glyma14g14220* responderam de forma semelhante. Visto que há uma maior proximidade filogenética entre os dois em comparação com o gene *Glyma04g6970*, e que têm um padrão concordante de expressão gênica, pode-se inferir isso se deva a uma duplicação gênica recente. Esse gene foi o único que apresentou uma repressão da expressão na planta inoculada, em relação à planta não inoculada, no acesso resistente (Fig. I.9B).

Doze horas após o inóculo, quando a hifa de penetração já atravessou a epiderme celular, a expressão dos três genes no genótipo suscetível (Figs. I.9A, I.10A e I.11A) apresentam uma tendência em alterar seus padrões de expressão, passando de uma situação de repressão para um início de indução, ainda que para os genes *Glyma04g6970* e *Glyma14g14220* a diferença nos níveis de expressão não sejam significativas em relação às plantas controle (Figs. I.9A e I.10A). Já no acesso resistente ocorreu um aumento de cerca de 32 e 124 vezes na expressão dos genes *Glyma04g6970* e *Glyma17g32100*, respectivamente (Fig. I.9B e I.11B), nas plantas inoculadas com o fungo, em relação às plantas não inoculadas. Para o gene *Glyma14g14220* também houve um aumento significativo de aproximadamente sete vezes (Fig. I.10B).

Vinte e quatro horas após a inoculação com o fungo, a expressão dos três genes na planta de genótipo suscetível, que vinha aumentando discretamente, aumentou de forma significativa: cerca de 64 vezes para os genes *Glyma04g6970* (Fig. I.9A) e *Glyma17g32100* (Fig. I.11A) e cerca de 1.024 vezes para o gene *Glyma14g14220* (Fig. I.10A). Nessa etapa, a hifa primária do fungo já formou um haustório entre as paredes celulares e membranas plasmáticas das células do mesófilo esponjoso, nutrindo-se da planta e secretando proteínas efetoras (Hahn *et al.*, 1997; Staples, 2000, 2001; Voegelé e Mendgen, 2003). A resposta intensa, porém tardia, da expressão dos genes que codificam as três proteínas HyPRPs poderia ser uma das causas da suscetibilidade do genótipo Embrapa-48 ao ataque do fungo *P. pachirizi*. A planta poderia apresentar uma tentativa atrasada de bloquear, pela modificação de sua parede celular, a invasão do patógeno. Para o acesso resistente, os genes apresentaram um aumento de expressão 12 h antes, estando com

sua expressão bastante reduzida ou até mesmo reprimida (Figs. I.9B, I.10B e I.11B) após 24 h da inoculação com urediniósporos. Essa antecipação, por sua vez, poderia ser um dos componentes que contribui para o fenótipo resistente.

Quarenta e oito h após a aplicação do inóculo, a expressão dos genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100* (Figs. I.10B e I.11B) voltou a aumentar nas plantas resistentes inoculadas com urediniósporos. A semelhança filogenética entre os genes *Glyma17g32100* e *Glyma14g14220* (Fig. I.4) é, mais uma vez, reforçada funcionalmente com esses resultados. O gene *Glyma04g06970*, ao contrário, teve sua expressão diminuída (Fig. I.9B) em relação às plantas controle no acesso resistente. No genótipo suscetível o gene *Glyma04g06970*, que vinha sendo altamente expresso, teve a sua expressão reduzida para níveis próximos a zero (Fig. I.9A), igualando-se aos níveis apresentados pelas plantas controle. Comportamento semelhante a este foi apresentado pelo gene *Glyma14g14220*, que teve, inclusive, sua expressão significativamente reprimida em relação às plantas controle (Fig. I.10A). Já o gene *Glyma17g32100* (Fig. I.11A) teve sua expressão altamente reprimida na planta tratada em relação às plantas controle.

Noventa e seis h após o inóculo dos urediniósporos, os três genes voltaram a apresentar um alto nível de expressão (aproximadamente oito vezes) para o acesso resistente (Figs. I.9B I.10B e I.11B). Nessa etapa da progressão do patógeno ocorre a invasão do espaço intercelular através de hifas secundárias e haustórios adicionais. No genótipo suscetível a expressão dos genes *Glyma04g06970*, *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100* continuou com níveis muito baixos em relação às plantas controle (Figs. I.9A, I.10A e I.11A).

Cento e noventa e duas h após o inóculo já estão sendo formados novos urediniósporos, que serão liberados a partir do 9º dia pela ruptura da epiderme. O acesso resistente mantém os níveis aumentados de expressão dos três genes (Figs. I.9B I.10B e I.11B) nas plantas inoculadas em relação às plantas controle. O genótipo suscetível voltou a apresentar, nesse período, um segundo momento de aumento significativo na expressão dos três genes nas plantas inoculadas (Figs. I.9A, I.10A e I.11A). Os genes *Glyma04g06970* e *Glyma17g32100* tiveram aumento de aproximadamente 100 vezes na sua expressão (Figs. I.9A e I.11A) e o gene *Glyma14g14220* chegou a aumentar em cerca de 16.000 sua expressão (Fig. I.10A).

Vários trabalhos mostram o envolvimento da parede celular em resposta a ataques

de patógenos. Soria-Guerra e colaboradores (2009), por meio da análise de transcritos em genótipo suscetível e resistente de *Glycine tomentella* durante a infecção por *P. pachirizi*, verificaram um aumento na expressão de genes de parede celular, tais como os da família das HRGPs. Khan e colaboradores, em 2004, com experimento de microarranjo, detectaram a expressão aumentada de vários genes de parede celular, entre eles PRPs e HRGPs, em resposta à invasão de nematoides em raízes de soja. O presente trabalho é o primeiro a descrever a cinética de resposta de genes *HyPRP* de soja após inoculação com o patógeno *P. pachirizi*.

Aparentemente o fator mais importante não é a intensidade de resposta dos genes (alta nas plantas suscetíveis) mas sim a sua antecipação como ocorre nas plantas resistentes. O gene *Glyma17g32100* talvez seja o mais interessante para ser utilizado em estratégias de melhoramento vegetal, uma vez que apresenta os maiores níveis de indução em plantas resistentes, podendo isso se indicativo da sua imprescindibilidade na resposta a ao ataque fúngico.

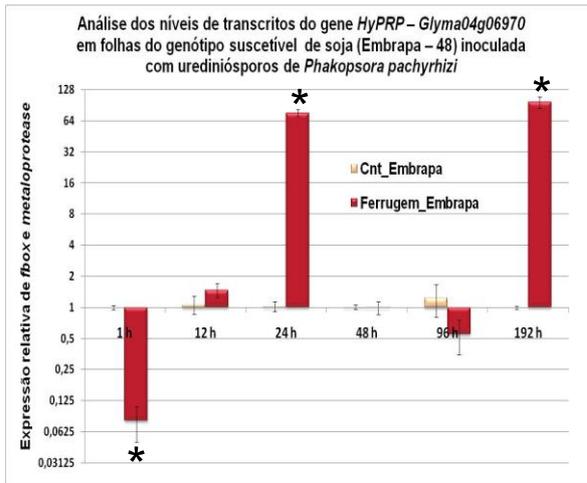
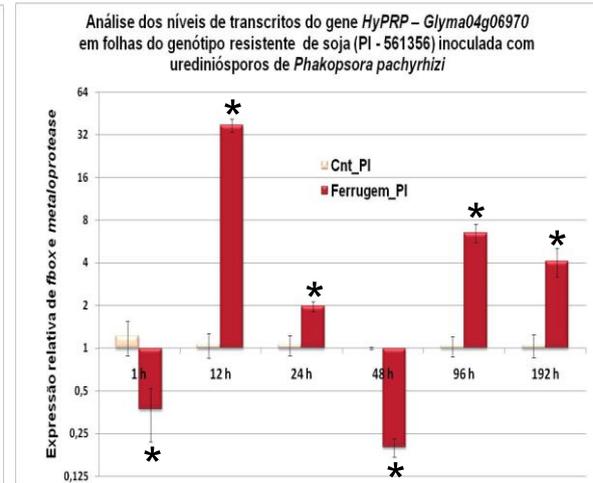
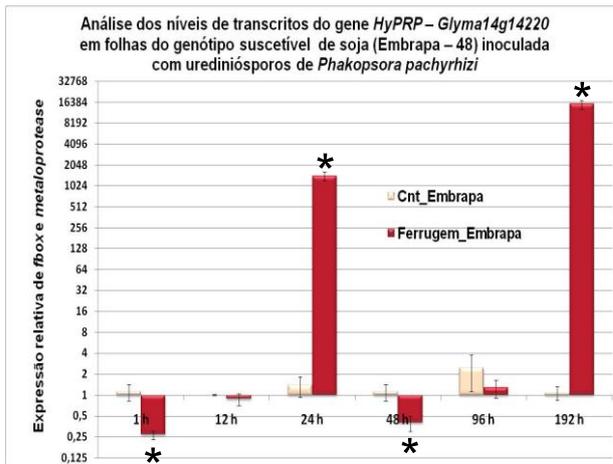
A**B**

Figura I.9: Gráficos, em escala logarítmica, mostrando os resultados dos experimentos de qPCR para o gene *Glyma04g06970* em diferentes intervalos de tempo após a inoculação com urediniósporos causadores da ferrugem asiática em soja. À esquerda (A) estão os resultados referentes às respostas no genótipo suscetível (Embrapa-48) e à direita (B) referentes às respostas no acesso resistente (PI). Em cada gráfico, as barras de cor rosa são relativas às plantas controle não inoculadas e as barras de cor vermelha são relativas às plantas inoculadas com os urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fbox* e *metaloprotease*. Desvio padrão indicado no topo das barras. Os experimentos de qPCR foram realizados no aparelho StepOnePlus™ -Applied Biosystems. Asteriscos representam tratamentos com resposta estatisticamente significativa segundo o teste T de Student.

A



B

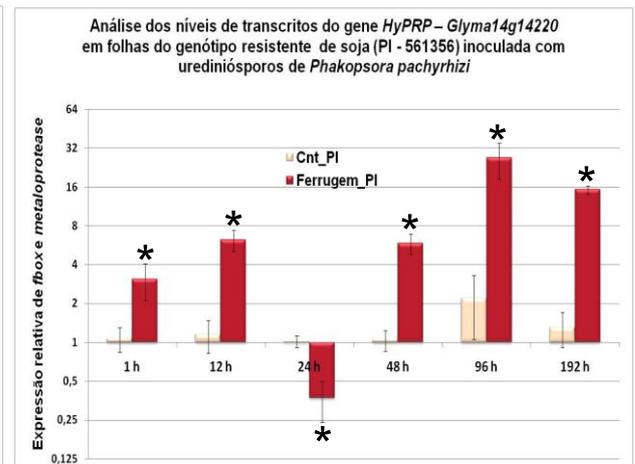
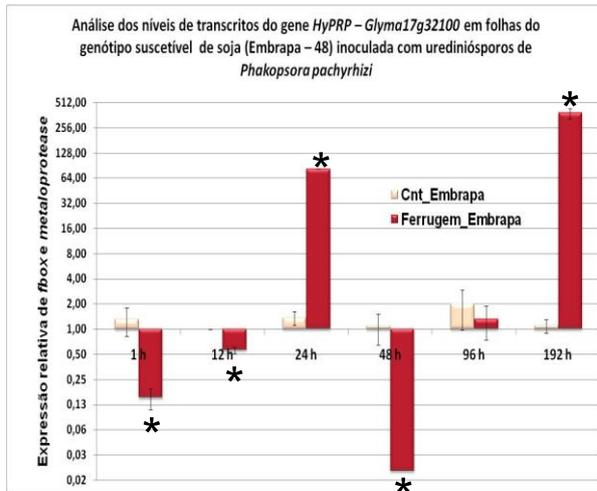


Figura I.10: Gráficos, em escala logarítmica, mostrando os resultados dos experimentos de qPCR para o gene *Glyma14g14220* em diferentes intervalos de tempo após a inoculação com urediniósporos causadores da ferrugem asiática em soja. À esquerda (A) estão os resultados referentes às respostas no genótipo suscetível (Embrapa-48) e à direita (B) referentes às respostas no acesso resistente (PI). Em cada gráfico, as barras de cor rosa são relativas às plantas controle não inoculadas e as barras de cor vermelha são relativas às plantas inoculadas com os urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fbox* e *metaloprotease*. Desvio padrão indicado no topo das barras. Os experimentos de qPCR foram realizados no aparelho StepOnePlus™ -Applied Biosystems. Asteriscos representam tratamentos com resposta estatisticamente significativa segundo o teste T de Student.

A



B

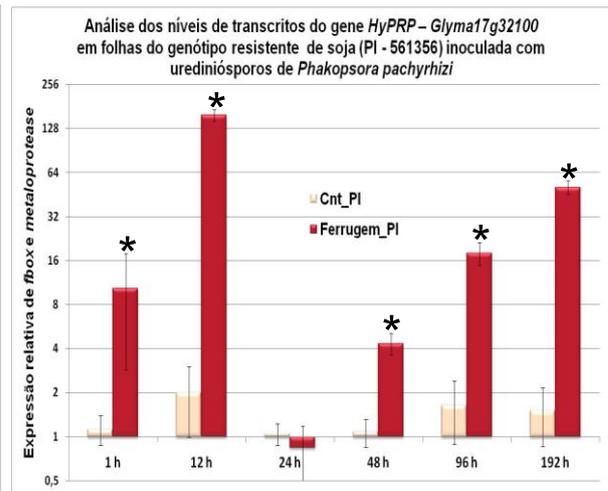


Figura I.11: Gráficos, em escala logarítmica, mostrando os resultados dos experimentos de qPCR para o gene *Glyma17g32100* em diferentes intervalos de tempo após a inoculação com urediniósporos causadores da ferrugem asiática em soja. À esquerda (A) estão os resultados referentes às respostas no genótipo suscetível (Embrapa-48) e à direita (B) referentes às respostas no acesso resistente (PI). Em cada gráfico, as barras de cor rosa são relativas às plantas controle não inoculadas e as barras de cor vermelha são relativas às plantas inoculadas com os urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *fbox* e *metaloprotease*. Desvio padrão indicado no topo das barras. Os experimentos de qPCR foram realizados no aparelho StepOnePlus™ -Applied Biosystems. Asteriscos representam tratamentos com resposta estatisticamente significativa segundo o teste T de Student.

CAPÍTULO II

II.1. Introdução

Conforme exposto no Capítulo I, com base na sequência do gene *SbPRP* (*Glyma14g14220*), que codifica uma proteína pertencente à família das HyPRP (Proteínas Híbridas Ricas em Prolina), foi possível identificar, no banco de dados Phytozome, outros três genes filogeneticamente muito próximos ao gene *SbPRP*.

He e colaboradores (2002) mostraram que o gene *SbPRP* está relacionado à resposta da planta de soja ao estresse hídrico. Naquele estudo foi verificado um aumento no perfil de expressão do gene *SbPRP* em folhas e epicótilos de soja, quando a planta foi submetida à falta de água e ao estresse salino. Conforme mencionado na Introdução Geral, o gene *SbPRP* de soja apresenta uma sequência de 381 pares de bases e a proteína SbPRP tem 126 aminoácidos. Esse gene, curiosamente, não possui sequências intrônicas interrompendo a sequência codificante. A proteína SbPRP de soja é composta por três domínios conservados: um domínio rico em prolínas (17 aminoácidos - PRD), um longo domínio hidrofóbico, rico em resíduos de cisteína (84 aminoácidos - 8CM) e um peptídeo sinal (25 aminoácidos - SP) na sua porção N-terminal. Essa proteína responde, também, a tratamentos com ácido salicílico e inoculação com o vírus-do-mosaico-da-soja, podendo, assim, ser considerada uma proteína de defesa da planta. Entretanto, a totalidade das funções fisiológicas da proteína SbPRP permanece desconhecida (He *et al.*, 2002).

A parede celular vegetal possui características únicas de organela, estrutura e ação enzimática (Lamport, 1965), responde aos estímulos intracelulares, como o de crescimento, e auxilia a célula a responder a estímulos externos, como, por exemplo, o ataque de patógenos (Hahn *et al.*, 1981). Para a execução de seu papel, que vai além do estrutural, a parede celular vegetal associa-se a proteínas, incluindo glicoproteínas com função estrutural e/ou enzimática. Entre as glicoproteínas encontradas na matriz extracelular, encontram-se basicamente dois grupos: (a) as proteínas arabinogalactanas, que são solúveis e (b) as extensinas, que são insolúveis. Outros grupos menos estudados e com função menos conhecida, também presentes na matriz extracelular, são as Proteína Ricas em Prolina (PRPs) e as Proteínas Híbridas Ricas em Prolinas (HyPRPs).

As HyPRPs, consideradas uma subdivisão das PRPs, são glicoproteínas bimodulares que apresentam um sacarídeo conjugado a um de seus aminoácidos, um

peptídeo-sinal direcionador para parede celular (SP), um domínio intermediário rico em resíduos de prolina (PRD), cuja repetição mais comum é PPVYK, e um motivo carboxi-terminal com oito resíduos de cisteína conservados (8CM) (Fig. I.1). O domínio 8CM está ausente nas PRPs (José-Estanyol *et al.*, 2000). Devido ao fato da proteína SbPRP estudada por He e colaboradores (2002), bem como os demais membros da família investigados no presente trabalho (Capítulo I) conterem o domínio 8CM, as mesmas devem ser classificadas como pertencentes à subdivisão das HyPRPs.

II.2. Objetivos

A fim de contribuir para o entendimento do papel das HyPRPs, embriões somáticos de soja foram submetidos a protocolos de transformação genética utilizando construções destinadas à superexpressão e ao silenciamento do gene *SbPR*, pertencente a esta família.

II.3. Material e Métodos

II.3.1. Material vegetal

Para a realização do trabalho foram utilizadas duas cultivares de soja recomendadas para plantio no Brasil, IAS5 e BRSMG 68 Vencedora, devido à suscetibilidade à infecção por *A. tumefaciens* e à capacidade de resposta aos estímulos da cultura *in vitro* (Droste *et al.*, 1994; Droste *et al.*, 2001; Silva A., 2005). As sementes foram obtidas da Embrapa Soja (Londrina, Paraná).

II.3.2. Extração de DNA de plantas de soja

O DNA genômico das plantas de soja foi extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), com modificações. Tecido foliar foi pulverizado em nitrogênio líquido e solubilizado em 800 µL de tampão CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0), 0,1 mg mL⁻¹ de Proteinase K e 16 µL de β-mercaptoetanol (2%). Após a pulverização, os tubos foram agitados durante 15 min e, então, incubados por 45 min a 65°C. Após esse período, os tubos foram retirados do banho e deixados resfriar à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 800 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio (v/v) em cada preparação, seguido de agitação manual por 15 min e centrifugação a 6000 rotações por minuto (rpm) por 15 min. A fase aquosa foi transferida

para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e a ela foram adicionados ½ volume de acetato de amônia 7,5 M e um volume de isopropanol gelado; esta mistura permaneceu a -20°C por 24 horas. Após esse período, o material foi centrifugado por 10 min a 12000 rpm, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com etanol 70% e deixado secar à temperatura ambiente. O DNA extraído foi suspenso em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) com 2 µL de RNase A (10 mg mL⁻¹). A mistura foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente.

As preparações de DNA coradas com brometo de etídio foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X (89 mM Tris-OH, 2 mM EDTA, 89 mM H₃BO₃, pH 8.2) sob corrente elétrica contínua de 100 mA. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e as amostras comparadas. Conforme a concentração verificada de DNA no aparelho Qubit™ da Invitrogen, foi estipulada a alíquota de DNA que seria utilizada por amostra para posterior utilização na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).

II.3.3. Projeção de Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos específicos para o gene *SbPRP* foram projetados com base na sequência desse gene, depositada no GenBank. O oligonucleotídeo direto anela na porção 5' da região codificante do gene, contendo o ATG correspondente ao códon de iniciação da tradução. O oligonucleotídeo reverso anela na porção 3' do gene, incluindo a trinca de nucleotídeos correspondentes ao códon de terminação. Na extremidade 5' do oligonucleotídeo direto foi adicionada a sequência CACC, que permite a clonagem do produto de PCR no vetor de entrada pENTR/D-TOPO®. Esse vetor possui no sítio de clonagem um fragmento de DNA de fita simples que é complementar à sequência CACC. As sequências desses oligonucleotídeos estão descritas no item abaixo.

II.3.4. Reação em Cadeia da DNA Polimerase

DNA extraído das plantas de soja foi usado como molde em reações em um volume final de 25 µL. Cada reação continha 100 µM de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase, tampão de reação 1X contendo 2,5 mM de MgCl₂, 100 nM de cada oligonucleotídeo e 100 ng de DNA. Como controle positivo das reações de amplificação foram utilizados os plasmídeos pGEM®T-Easy-*SbPRP* para o gene *SbPRP* e

pH7WG2d.1,0 para o gene *hpt*, nas concentrações finais de 2 ng μL^{-1} . Os seguintes oligonucleotídeos (sentido 5' – 3') foram utilizados: *hpt*-for GCGATTGCTGATCCCCATGTGTAT e *hpt*-rev GGTTTCCACTATCGGCGAGTACTT, para o gene *hpt*; *SbPRP*-for CACCATGGCTTCCAACAAGGTTATTG e *SbPRP*-rev CTATGCACATTGGAAGCCAGCAGGAACAGTT, para o gene *SbPRP*; e íntron-for TCAAGCTGACCTGCAAACAC e íntron-rev TGCCTCTTCTTACGGCTTTC, para um íntron de um gene de *Arabidopsis thaliana*, presente no vetor pH7GWIWG2(II). Estes oligonucleotídeos amplificam fragmentos de 622, 381 e 646 pares de bases dos genes *hpt*, *SbPRP* e do íntron, respectivamente.

As condições de amplificação foram: 5 min de desnaturação a 94°C; 30 ciclos de 45 s de desnaturação, a 94°C, 45 s de anelamento, a 55°C e 45 s e 60 °C de extensão, a 72°C; 5 min de extensão final a 72°C. Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese a 100 mA em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

II.3.5. DNA - polimerases

De acordo com as necessidades de cada reação de amplificação, as seguintes DNA-polimerases foram empregadas:

- Platinum® *Taq* DNA Polymerase ou Platinum® Pfx DNA Polymerase
- Taq* DNA Polymerase (nativa e recombinante) -Invitrogen: análise de clones.

II.3.6. Sistema Gateway

O sistema *Gateway*, desenvolvido pela Invitrogen, baseia-se no mecanismo empregado pelo bacteriófago Lambda (λ) para integrar-se em genomas hospedeiros. O vetor de entrada pENTR/D-TOPO® pode ser recombinado com qualquer vetor compatível que possua sítios *att* de recombinação. Em um mesmo tubo de microcentrífuga, adiciona-se o vetor pENTR, contendo a sequência de interesse clonada, juntamente com o vetor de destino, onde se quer ter o gene inserido [Ex. vetores pH7WG2d.1,0 para a superexpressão e pH7GWIWG2(II) para o silenciamento]. No mesmo tubo adiciona-se, ainda, a mistura enzimática chamada de Clonase, que é composta de integrase, excisionase e fator auxiliar de integração (IHF). Após uma hora de recombinação, a reação está pronta para ser transformada na linhagem *TOP10* de *Escherichia coli*. Há a necessidade de utilizar a linhagem *TOP10*, pois a mesma não possui o episossomo F', no qual está contido o gene

ccdA, antitoxina de *ccdB*.

II.3.7. Vetores

Vetor pGEM[®]T-Easy: foi utilizado para clonagem do produto de amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos específicos para o gene *SbPRP*. O vetor possui 3.015 pb, gene de resistência para o antibiótico ampicilina e sítio de clonagem interrompendo o gene codificador da β -galactosidase. Na presença de X-Gal (indutor) é possível selecionar clones que incorporaram o fragmento através da seleção de colônias brancas em placas contendo meio LB, ampicilina e X-Gal. Clones positivos foram sequenciados para a confirmação da clonagem do fragmento contendo todo o gene *SbPRP* de soja.

Vetor pENTR/D-TOPO[®]: Possui 2.580 pb, gene de resistência à canamicina e sítios *att* de recombinação sítio específica do bacteriófago λ . O vetor pENTR possui duas topoisomerasas ligadas covalentemente nas extremidades que sofrerão ataque nucleofílico para subclonar fragmentos de PCR. Para inserção em orientação correta do fragmento há a necessidade da adição da sequência CACC na extremidade 5' do oligonucleotídeo direto, pois o vetor possui no sítio acceptor a sequência GTGG. Este vetor permite, através de recombinação, a integração do fragmento subclonado em qualquer outro vetor destino, que possua os sítios *att* de recombinação sítio específica do bacteriófago λ .

Vetor de superexpressão - pH7WG2D.1,0 (Fig II.1A): Vetor binário, com 13.181 pb, resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomomicina, sítios de recombinação pelo sistema do bacteriófago λ , gene tóxico *ccdB* na posição onde ocorre a integração de genes exógenos. O gene *ccdB* codifica a toxina inibitória da topoisomerase II da *E. coli*. Assim, plasmídeos não recombinantes matam a célula transformada. A sequência nucleotídica clonada no vetor fica sob controle do promotor e terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor.

Vetor de silenciamento por hRNAi - pH7GWIWG2(II) (Fig II.1B): Vetor binário, com 13.291 pb, resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomomicina, sítios de recombinação pelo sistema do bacteriófago λ , gene tóxico *ccdB* nas posições onde ocorrerão as integrações do gene exógeno. As duas sequências nucleotídicas subclonadas no vetor ficam sob controle do promotor e terminador 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Entre as sequências subclonadas, encontra-se um íntron, que serviu de alça do grampo de silenciamento. No interior desse íntron, proveniente de *A. thaliana*, encontra-se o gene

procarionótico *CmR*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. Adicionando cloranfenicol no meio de cultura, multiplicam-se somente as bactérias que receberam um vetor intacto em relação à presença do íntron (Karimi *et al.*, 2002).

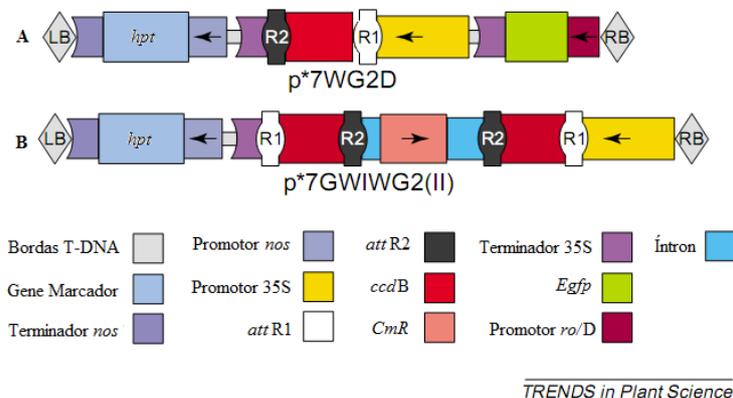


Figura II.1: Mapa dos vetores binários de destino, em (A) superexpressão e em (B) silenciamento. Ambos compatíveis com o sistema de clonagem por recombinação, Gateway. Figura adaptada de Karimi *et al.* (2002).

II.3.8. Genótipo das linhagens de *E. coli* que foram utilizadas

E. coli XLI-Blue, para transformação e multiplicação plasmidial:

endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+).

E. coli Top10: para as etapas de seleção dos clones recombinantes:

F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-.

II.3.9. Transformação de *E. coli* por eletroporação

As bactérias competentes para eletroporação foram preparadas seguindo o protocolo descrito a seguir. Uma pré-cultura foi preparada inoculando a bactéria em 50 mL de meio de cultura Luria-Broth (LB) líquido e mantendo a mesma sob agitação constante de 225 rpm, a 37°C por 16 h. Em seguida, 10 mL da pré-cultura foram diluídos em 1 L de LB líquido. Esta cultura foi mantida sob agitação nas mesmas condições anteriores até a mesma atingir densidade ótica de 0,5-0,8 em absorvância de 600 nm. A cultura foi resfriada no gelo por 30 min e, a seguir, centrifugada a 4.000 rpm por 15 min, a 4°C. Após

o descarte do sobrenadante, o precipitado contendo as células concentradas foi suspenso em 1 L de água destilada a 4°C. A centrifugação foi repetida e as células foram lavadas com 500 mL de água destilada. A mistura foi centrifugada novamente a 4.000 rpm por 15 min, a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi, então, suspenso em 3 mL de glicerol 10 % a 4°C, dividido em alíquotas de 80 µL, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em *freezer* a -80 °C. Durante toda a manipulação, as amostras foram conservadas no gelo.

Para a transformação de *E. coli* por eletroporação, um volume entre 1 e 1,5 µL do produto da reação de recombinação ou DNA plasmidial foi misturado com 40 µL de bactéria competente. A mistura foi submetida a uma voltagem de 2,5 V. Após a eletroporação, 250 µL de LB líquido foi acrescentado à cubeta de eletroporação. O material foi, então, transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e mantido a 37°C por 1 h. Volumes de 40 e 200 µL da suspensão de bactérias foram inoculados em 2 placas com meio LB sólido contendo ampicilina (200 µg mL⁻¹) para seleção das bactérias transformadas com vetor pGEM[®]-T Easy, canamicina (25µg mL⁻¹) para seleção de bactérias transformadas com o vetor pENTR e espectiomicina (50µg mL⁻¹) para seleção de bactérias transformadas com os vetores de destino pH7WG2D.1,0 e pH7GWIWG2(II). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 17 h. As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio contendo o antibiótico de seleção foram selecionadas para extração de plasmídeos. A transformação das colônias de bactérias selecionadas foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *SbPRP* e *hpt*.

II.3.10 Minipreparação de plasmídeo (Miniprep)

Colônias isoladas de bactérias *E. coli* contendo os vetores de clonagem, entrada e os binários descritos acima foram selecionadas e inoculadas em 4 mL de meio de cultura LB líquido contendo: ampicilina (200 µg mL⁻¹) para seleção das bactérias transformadas com vetor pGEM[®]-T Easy, canamicina (25 µg mL⁻¹) para o vetor pENTR e espectiomicina (50 µg mL⁻¹) para os vetores de superexpressão e silenciamento. A extração de plasmídeos (ou miniprep) foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Células de 1,5 mL da suspensão de bactérias foram coletadas por centrifugação em 13.000 rpm por 1 min. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado contendo as células foi suspenso com 200 µL de solução I (Tris-HCl a 25 mM, pH 8,0; EDTA a 10 mM; glicose a 25 mM).

Em seguida 200 µL de solução II contendo NaOH a 0,2 M e SDS a 1 % foi misturada lentamente por inversão à mistura anterior. Finalizando esta etapa de lise, 200 µL de solução III contendo (CH₃COONa a 5 M, pH 5,2) foi adicionada e também homogeneizada por inversão. Após centrifugação por 5 min a 13.000 rpm, 600 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Os plasmídeos foram, então, precipitados utilizando 600 µL de isopropanol e centrifugação por 20 min em 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 350 µL de etanol 70 %. A mistura foi centrifugada novamente por 5 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em estufa a 37°C. Os plasmídeos extraídos foram suspensos em 50 µL de água Milli-Q autoclavada.

II.3.11. Plasmídeos, linhagem de *Agrobacterium* e condições de cultura das bactérias

Os vetores de transformação selecionados para este trabalho - pH7WG2d.1,0 para superexpressão e pH7GWIWG2(II) para o silenciamento, foram introduzidos por choque térmico em inóculos independentes da linhagem LBA4404 de *A. tumefaciens*.

Quarenta e oito horas antes da transformação, uma colônia isolada de cada inóculo de *A. tumefaciens* foi cultivada, independentemente, em meio LB líquido, contendo espectinomicina 50 mg L⁻¹, rifampicina 50 mg L⁻¹ e acetosiringona 100 µM, sob agitação contínua, à temperatura de 28°C. Após este período, as células bacterianas foram centrifugadas e suspensas em meio D10 líquido (D40 com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D, pH 6,4) para DO_{600nm} de 0,3.

II.3.12. Coleta dos legumes e indução de embriogênese somática

Legumes, colhidos 20 a 30 dias após a floração, foram desinfetados com álcool 70%, por um minuto, e hipoclorito de sódio 3% com algumas gotas de *Tween* 20, por 20 minutos. Logo após, eles foram enxaguados quatro vezes com água destilada autoclavada para a remoção dos resíduos químicos. O eixo embrionário de sementes imaturas com 3-4 mm foi retirado e cada cotilédone, deitado em placa de Petri com a face abaxial em contato com o meio de indução D40 (Bailey *et al.*, 1993), composto por sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 40 mg L⁻¹ 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 0,3% Phytigel[®], 3% sacarose, pH 7,0 (antes de autoclavar). Vinte cotilédones foram colocados em cada placa, sendo mantidos durante todo o experimento à

temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, com intensidade luminosa de $22,5\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

II.3.13. Proliferação dos embriões somáticos secundários

Após 30 dias de exposição ao meio D40, os cotilédones, já apresentando embriões somáticos primários e secundários, foram transferidos para meio de proliferação D20 (Wright *et al.*, 1991), que equivale ao meio D40 com $20\ \text{mg L}^{-1}$ 2,4-D e pH 6,4 (anterior à autoclavagem). Os conjuntos embriogênicos foram destacados da superfície dos cotilédones após 14 dias e proliferaram em meio D20 com subculturas a cada 14 dias.

Os embriões somáticos foram transformados nesta fase, assim que a cultura atingiu níveis desejados de proliferação.

II.3.14. Transformação

Dois experimentos de transformação independentes foram conduzidos com cada construção.

Quarenta e oito horas antes da transformação, os conjuntos embriogênicos foram transferidos para meio D20 novo. No momento do bombardeamento, os conjuntos foram posicionados no centro da placa de Petri, a qual foi mantida aberta por 15 minutos na câmara de fluxo laminar para evaporação do excesso de líquido sobre a superfície do tecido vegetal, reduzindo a turgescência dos embriões e impedindo a explosão das células superficiais com o bombardeamento (Vain *et al.*, 1993).

O primeiro experimento de transformação visou a integração do T-DNA do vetor de superexpressão e do vetor de silenciamento contendo o gene de interesse empregando o protocolo que combina bombardeamento com o sistema *Agrobacterium*, descrito por Droste e colaboradores (2000), com as modificações descritas a seguir. Foram utilizadas 30 placas, sendo 15 da cultivar IAS5 e 15 da cultivar Vencedora, para cada construção. O bombardeamento foi usado para ferir o tecido alvo antes da inoculação da *Agrobacterium*. Sinais químicos liberados pelas células feridas aumentariam a adesão da *Agrobacterium* e a subsequente transferência de genes para as células vegetais (Hooykaas *et al.*, 1991; Bidney *et al.*, 1992). O bombardeamento foi realizado em um acelerador de partículas de baixa pressão, modelo PIG (Finer *et al.*, 1992). Vinte e cinco μL de uma suspensão de micropartículas de tungstênio em água destilada estéril foram misturados a $25\ \mu\text{L}$ CaCl_2 (2,5 M) e $15\ \mu\text{L}$ espermidina (0,1 M). Após 5 minutos precipitando no gelo, $45\ \mu\text{L}$ do

sobrenadante foram descartados. Um tiro foi disparado por placa utilizando 2 μL do precipitado. Após o bombardeamento, o tecido vegetal de cada placa foi inoculado na suspensão de *A. tumefaciens* e incubado durante 20 minutos. Ao retirar os conjuntos embriogênicos da suspensão bacteriana, eles foram secos em papel-filtro autoclavado e transferidos para meio D20 contendo acetoseringona 100 μM para co-cultivo por 48 horas.

O segundo experimento de transformação visou a integração do gene de interesse por meio do bombardeamento de micropartículas de tungstênio carreadoras dos plasmídeos de superexpressão ou silenciamento construídos. Foram utilizadas 30 placas para cada construção, sendo 15 da cultivar IAS5 e 15 da cultivar Vencedora. O procedimento empregado foi baseado em um protocolo de transformação por biolística descrito por Finer e McMullen (1991) com modificações de acordo com Droste e colaboradores (2002). Utilizou-se um acelerador de partículas de baixa pressão (cerca de 60 psi) de gás hélio [ou *Particle Inflow Gun* - PIG (Finer *et al.*, 1992)] construído no Departamento de Física da UFRGS. A preparação do DNA a ser introduzido nas células foi realizada da seguinte forma: foram adicionados ao DNA 25 μL de tungstênio suspenso em água destilada estéril, a 100 mg mL^{-1} . A seguir, foram adicionados à suspensão 25 μL de CaCl_2 2,5 M e 10 μL de espermidina 0,1 M. Após uma incubação em gelo por 5 minutos, 45 μL do sobrenadante foram descartados, e o precipitado foi suspenso no volume de solução restante (cerca de 15 μL). Para cada disparo foram utilizados 2 μL da preparação. A preparação com o DNA foi colocada no centro de uma rede, em um filtro de seringa estéril, que foi, então, acoplado à câmara de vácuo do PIG. A placa contendo o material vegetal foi posicionada a 15 cm do filtro. À distância de nove cm do filtro foi colocada uma rede de náilon. Esta rede teve a finalidade de evitar o espalhamento dos embriões como resultado do choque com as partículas, propiciando, também, uma melhor distribuição das partículas bombardeadas (Vain *et al.*, 1993). Após cada bombardeio, o material foi mantido na mesma placa de Petri.

II.3.15. Supressão de *Agrobacterium* e seleção dos clones transformados no experimento 1

O procedimento adotado nesta etapa seguiu o protocolo descrito por Wiebke e colaboradores (2006). Após o co-cultivo, os conjuntos embriogênicos foram ligeiramente lavados em água destilada autoclavada, secos em papel-filtro autoclavado e transferidos

para meio D20 contendo 250 mg L⁻¹ de cefotaxima (Claforan[®], Laboratório Hoechst Marion Roussel S/AI) e 250 mg L⁻¹ de vancomicina (Vanclomin[®], Teuto Brasileiro). Os explantes permaneceram neste meio por 10 dias e, então, foram transferidos para novo meio contendo 250 mg L⁻¹ de cefotaxima, 250 mg L⁻¹ de vancomicina e 12,5 mg L⁻¹ de higromicina-B (Sigma). Após 21 dias adicionais, o material vegetal foi novamente transferido para novo meio D20 suplementado com os mesmos antibióticos, mas com uma concentração maior de higromicina (25 mg L⁻¹). Os tecidos embriogênicos foram mantidos neste meio até que o tratamento com cefotaxima e vancomicina completasse um período total de 63 dias. Então, os conjuntos de embriões foram mantidos em meio D20 com higromicina (25 mg L⁻¹) até que este tratamento completasse um período total de 150 dias. Subculturas foram realizadas a cada 14 dias. Após esse período, as porções de tecido higromicina-resistentes foram separadas e proliferadas individualmente por mais 30 dias em meio D20 sem antibióticos.

II.3.16. Seleção dos clones transformados no experimento 2

Após o bombardeio, os embriões permaneceram no meio de proliferação (MSD20) por 15 dias. A seguir, foram transferidos para meio de proliferação MSD20 contendo o antibiótico higromicina, na concentração de 12,5 mg L⁻¹. Após duas semanas neste meio, os embriões foram mantidos por dois meses e meio em MSD20 contendo higromicina a 25 mg L⁻¹, com trocas para meio fresco a cada 14 dias, completando-se, assim, 150 dias de seleção. Após esse período, as porções de tecido higromicina-resistentes foram separadas e proliferadas individualmente por mais 30 dias em meio D20 sem antibióticos.

II.3.17. Histodiferenciação e conversão dos embriões em plantas

Conjuntos embriogênicos resistentes à higromicina e proliferantes foram transferidos para meio de histodiferenciação MSM6 modificado (Finer e McMullen, 1991), composto por sais MS, vitaminas B5, 0,3% Phytigel[®], pH 6,4 (anterior à autoclavagem), 1% carvão ativo e 6% sacarose, em substituição à maltose originalmente descrita. Após 30 dias, os embriões foram individualizados e transferidos para novo meio de histodiferenciação sem carvão, onde permaneceram por mais 30 dias.

Após esse período, os embriões foram transferidos para o meio de regeneração MS0, que corresponde ao meio de maturação com 3% sacarose. As plântulas que

desenvolveram meristemas radicular e foliar foram transferidas para vidros contendo meio de regeneração, onde permanecerão até atingirem cerca de 4 cm. Os embriões que ainda não desenvolveram meristemas radicular e foliar permanecem sendo transferidos a cada 30 dias para novo meio MS0. O sucesso na obtenção de uma plântula é registrado quando do desenvolvimento de raízes primárias e ao menos uma folha trifoliolada (Bailey *et al.*, 1993). As plântulas são transferidas para copos plásticos contendo vermiculita e cobertos com filme plástico, sendo lentamente aclimatadas e, então, transplantadas para o solo, em contenção.

II.4. Resultados e Discussão

II.4.1. Clonagem do gene *SbPRP*

Com base na sequência do gene *SbPRP* depositada no GenBank, foram projetados oligonucleotídeos iniciadores capazes de anelar na porção 5' do gene, incluindo a trinca ATG, correspondente ao códon de início da tradução; e na região 3', incluindo nesta, a trinca correspondente ao códon de término da tradução. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas em Material e Métodos deste capítulo.

Um experimento de Reação em Cadeia da Polimerase foi realizado a fim de amplificar um fragmento de 381 pares de bases correspondente a toda região codificadora do gene *SbPRP* de soja. O DNA de soja extraído, conforme descrito em Material e Métodos, foi utilizado como molde para a reação. Uma vez que o gene, estruturalmente, não apresenta íntrons, não houve a necessidade de sintetizar cDNA para viabilização da clonagem do gene na sua forma madura (CDS). Como resultado foi obtida uma amplificação bastante específica para o fragmento de tamanho esperado (381 pb) para o gene *SbPRP* (Fig II.2).

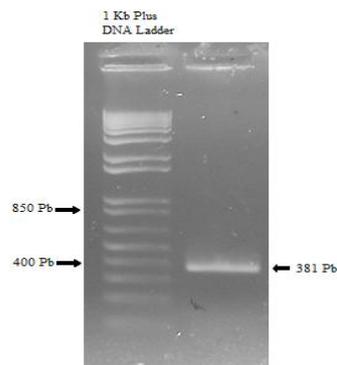


Figura II.2: Gel de agarose 0,8%, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para *SbPRP*. A banda presente na segunda canaleta, indicada pela seta, corresponde ao fragmento de 381 pb obtido na reação de amplificação, usando-se o DNA de soja como molde. Marcador de peso molecular: 1 Kb plus Ladder–Invitrogen.

Com o resultado positivo da PCR, foi iniciada a clonagem do fragmento amplificado no vetor pGEM[®]-T Easy. As colônias brancas obtidas foram selecionadas para extração de plasmídeo por lise alcalina. Alguns clones foram sequenciados, confirmando a clonagem do gene *SbPRP* livre de mutações. Sendo uma sequência relativamente pequena, o processo de clonagem foi bastante facilitado, obtendo-se o clone positivo rapidamente.

II.4.2. Construção dos vetores de superexpressão e silenciamento

Após a obtenção do clone em pGEM[®]-T Easy com o inserto desejado (pGEM-*SbPRP*), o gene *SbPRP* foi subclonado no vetor pENTR/D-TOPO[®]-Invitrogen, originando o vetor pENTR/D-TOPO-*SbPRP*. A clonagem no vetor pENTR/D-TOPO[®] também foi confirmada por PCR. Sendo o vetor pENTR/D-TOPO[®] compatível com o sistema Gateway[™]-Invitrogen, foram feitas recombinações com os vetores de destino pH7WG2d.1,0 para superexpressão e pH7GWIWG2(II) para silenciamento. Tanto para a construção do vetor de silenciamento quanto para a de superexpressão utilizou-se a sequência completa do gene *SbPRP*.

PCRs para confirmação das clonagens foram realizadas utilizando-se como DNA molde o DNA plasmidial correspondente aos vetores de superexpressão e silenciamento já recombinados com pENTR/D-TOPO-*SbPRP*. O DNA molde referido foi obtido por miniprep.

Primeiramente, foi realizada uma PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores

do próprio gene *SbPRP*. O resultado pode ser visto na Figura II.3, onde estão sendo mostradas as bandas de amplificação de fragmentos do tamanho esperado de 381pb.

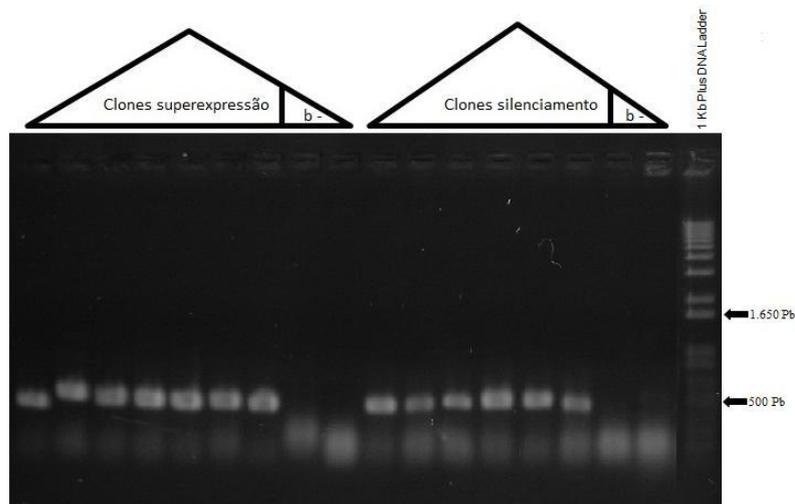


Figura II.3: Gel de agarose 0,8%, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para *SbPRP*. Triângulos demarcam os clones de superexpressão à esquerda e de silenciamento à direita. Negativo (reação contendo vetor selvagem) indicado por “-” e branco (reação sem DNA) por “b”. Marcador de peso molecular: 1 Kb plus DNA Ladder – Invitrogen.

Uma segunda PCR foi realizada para confirmar que os clones obtidos correspondiam aos corretos vetores de superexpressão (pH7WG2d.1,0) e silenciamento (pH7GWIWG2(II)). A Figura II.4 mostra o resultado da amplificação do gene *hpt* de 622 pares de base, que está presente na região do T-DNA contida em ambos os vetores. Esse resultado confirmou a presença do gene de resistência *hpt*, o que contribuiu para a maior certeza de estar-se com as corretas construções a serem empregadas no dispendioso processo de transformação da soja.

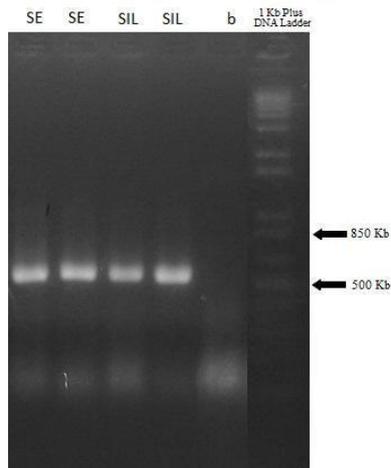


Figura II.4: Gel de agarose 0,8%, mostrando o resultado da reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para o gene *hpt*. As duas primeiras canaletas correspondem aos clones de superexpressão (SE) e a terceira e quarta canaletas aos clones de silenciamento (SIL). Branco (reação sem DNA) indicado por “b”. Marcador de peso molecular: 1 Kb plus DNA Ladder - Invitrogen.

As primeiras tentativas de construção de um vetor de silenciamento foram realizadas utilizando o vetor comercial pH7GWIWG2(I). No entanto, um problema recorrente ocorreu na utilização deste vetor. Durante o processo de recombinação, construções anômalas foram geradas por, aparentemente, perderem o íntron formador da alça do grampo de silenciamento posicionada entre as cópias senso e antisenso. Sabendo-se que a presença de um íntron formando a alça do grampo de silenciamento aumenta enormemente a eficiência do silenciamento em relação a outras construções (por exemplo, quando a alça está ausente) (Smith *et al.*, 2000), passou-se a investir esforços na recombinação com outro vetor comercial, pH7GWIWG2(II). Essa segunda edição de vetores contém o gene *CmR*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol, no interior do íntron formador da alça do grampo, permitindo impor uma pressão seletiva no meio de cultura, através presença do antibiótico cloranfenicol. Com a intensidade da seleção aumentada foi possível encontrar clones corretamente construídos ou, pelo menos, que não houvessem perdido o íntron durante a recombinação.

Uma PCR para o íntron também foi realizada, a fim de confirmar a presença do mesmo (dado não mostrado).

O resultado positivo das recombinações foi igualmente confirmado por

sequenciamento. Uma vez confirmada a correta construção dos vetores de superexpressão e silenciamento, o processo de transformação da soja foi iniciado.

II.4.3. Transformação da soja

Foram realizados dois experimentos independentes de transformação: o primeiro utilizando o protocolo que combina bombardeamento com o sistema *Agrobacterium*, e o segundo empregando o protocolo de biolística. Para cada experimento, um total de 60 placas, contendo 15 conjuntos de embriões somáticos por placa, foram utilizadas. Destas 60 placas, 30 continham embriões da cultivar IAS5 e 30 da cultivar Vencedora.. De cada cultivar, 15 placas foram bombardeadas com a construção para superexpressão e 15 placas com a construção para o silenciamento do gene *SbPRP*.

Em ambos os experimentos, a seleção dos embriões transformados foi feita em meio D20 com higromicina (25 mg L⁻¹). Em experimentos anteriores, realizados em nosso laboratório (Droste *et al.*, 2002; Sachet, 2005; Wiebke, 2005; Weber, 2007; Homrich *et al.*, 2008), o período de seleção foi em média de 90 dias. No entanto, no presente trabalho, esse tempo teve de ser enormemente estendido para 150 dias. Em uma condição normal, após 90 dias é possível visualizar a necrose dos embriões não transformados, ou seja, aqueles que não adquiriram o gene *hpt*, que confere resistência à higromicina. Entretanto, verificou-se, neste experimento, que pouquíssimos embriões apresentavam sensibilidade à higromicina, permanecendo a maioria deles vivos na presença do antibiótico. Com o período mais longo de seleção foi verificada a necrose do tecido embriogênico não-transformado, mas porções de tecido higromicina-resistentes foram visualizadas, em grande número, em ambos os experimentos.

Os tecidos higromicina-resistentes foram transferidos para meio de histodiferenciação, onde permaneceram por 60 dias. Após este período, no primeiro experimento (bombardeamento/*Agrobacterium*) foi possível contar 1.235 embriões histodiferenciados obtidos a partir de 17 conjuntos (14 da cultivar IAS5 e 3 da cultivar Vencedora). Para o segundo experimento (biolística) foi possível contar 539 embriões histodiferenciados obtidos a partir de 14 conjuntos (11 da cultivar IAS5 e 3 da cultivar Vencedora). Cada um dos conjuntos higromicina-resistentes, provavelmente, derivam de eventos independentes de transformação.

Os embriões histodiferenciados foram transferidos para meio de regeneração, no

qual a maioria permanece até o momento. À medida que os embriões desenvolvem raiz e ao menos uma folha eles são transferidos para frascos contendo o mesmo meio de regeneração. Já foram obtidas cinco plântulas no experimento de biolística visando à superexpressão do gene em estudo. Quatro plântulas trifolioladas da cultivar IAS5 são oriundas de três eventos independentes de transformação. Também foi obtida uma plântula trifoliolada da cultivar Vencedora. As plântulas serão mantidas em frascos até atingirem o tamanho de 4 cm. Depois disso, essas plantas serão transferidas para copos plásticos contendo vermiculita e cobertos com filme plástico, sendo lentamente aclimatadas e, então, transplantadas para o solo em contenção.

Na atual etapa, análises moleculares das plântulas ainda não puderam ser realizadas devido à fragilidade e incipiência em que o material se encontra.

Embora ainda não finalizado, como resultado do experimento de transformação, não foram obtidas muitas plantas transformadas. Partindo de 450 aglomerados embriogênicos que foram submetidos ao experimento de transformação para cada construção, o esperado seria um número maior de conversão de embriões a plântulas do que as atuais cinco obtidas. Estas são oriundas de material transformado visando à superexpressão do gene *SbPRP*. Nenhuma plântula foi obtida, até o momento, a partir do material transformado com a construção para o silenciamento desse gene. Apesar da transformação de embriões somáticos de soja ter uma eficiência sabidamente baixa (Droste *et al.*, 2002; Homrich *et al.*, 2008) outros fatores podem estar sendo responsáveis pela baixa taxa de conversão, como discutidos abaixo.

Para os embriões transformados com o vetor de silenciamento, cabe lembrar que foi utilizado o gene *SbPRP* inteiro na construção deste vetor. Sendo a família das HyPRPs composta por vários membros, 35 em soja, o silenciamento pode ter sido severo demais, atingindo muitos genes não alvo, tanto da própria família *HyPRP*, como de outras famílias gênicas não relacionadas. O ideal teria sido construir um vetor contendo somente uma porção do gene *SbPRP*, aumentando, assim, a especificidade de atuação da maquinaria celular de silenciamento.

Mesmo que não tenha ocorrido o silenciamento de genes não-alvo, ainda assim o silenciamento exclusivo do gene *SbPRP* pode estar sendo letal. Hall e colaboradores mostraram, em artigo publicado na revista científica *The Plant Cell*, em 2002, que um mutante nulo de *Arabidopsis thaliana* para o gene *AtEXT3* (*rsh*), que codifica uma proteína

pertencente à família das proteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs), composta por 20 membros em *A. thaliana*, tem um fenótipo letal (Hall *et al.*, 2002). O mutante para o gene *AtEXT3* é chamado de *rsh* (*root-shoot-hypocotyl-defective*). O papel deste gene está diretamente relacionado com o correto posicionamento da placa celular durante a citocinese das células embrionárias em desenvolvimento. Provavelmente, sua capacidade de auto-associação permite que se forme um arcabouço glicoproteico que serve de ancoragem aos componentes formadores da parede celular nascente (Cannon *et al.*, 2008). As células do mutante homocigoto *rsh* apresentam formas e tamanhos irregulares. A glicoproteína RSH localiza-se na parede celular, expressando-se por todo embrião. No entanto, em estágios pós-embrionários, está presente somente em locais específicos. Estando as glicoproteínas HyPRPs localizadas na parede celular e por possuírem um domínio rico em prolina, assim como também ocorre com as HRGPs (Jose-Estanyol e Puigdomènech, 2000), é possível que também tenham papel crucial na correta ontogenia do embrião. Com isso não fica descartada a possibilidade de que o silenciamento do gene *SbPRP* seja letal para a soja.

Para a superexpressão não existe a problemática do silenciamento de genes não-alvo, salvo a possibilidade de que um fenômeno de co-supressão esteja ocorrendo. Outra hipótese que justificaria o baixo número de plantas obtidas até agora poderia ser o fato de que o gene *SbPRP* é um gene de parede celular que pode estar envolvido na ontogenia desta. Trabalhos mostram também que os membros da família gênica *HyPRP* têm um padrão de expressão bastante específico, sendo temporal e espacialmente regulados (Subramaniam *et al.*, 1994; Bouton *et al.*, 2005; Lenka *et al.*, 2007). Assim, é possível que a presença constitutiva da proteína *SbPRP* possa estar impedindo o desenvolvimento normal dos embriões.

Por meio da análise da parede celular dos embriões transformados por cortes histológicos e microscopia eletrônica, o presente trabalho pode contribuir para o progresso no entendimento da função das HyPRPs em plantas de soja.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho obteve, com os resultados mostrados no Capítulo I, dados que possibilitaram a compreensão da estruturação genômica dos genes que codificam as proteínas HyPRPs em soja, um melhor entendimento das proximidades filogenéticas entre os membros desta família e uma melhor compreensão do padrão de expressão de três membros *HyPRP* (*Glyma04g06970*, *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100*) filogeneticamente muito próximos.

Os genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100*, mais próximos filogeneticamente, responderam de maneira muito semelhante, sendo sempre induzidos ou reprimidos conjuntamente perante cada tratamento. O gene *Glyma04g06970* nem sempre teve um padrão de expressão concordante com os genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100*. No tratamento de raízes com ácido salicílico, foi o único que não alterou sua expressão em relação ao controle e, no tratamento com cloreto de sódio, foi o único que não foi reprimido. A expressão basal do gene *Glyma17g32100*, foi, na maioria das situações, sempre mais elevada que a dos genes *Glyma14g14220* e *Glyma17g32100*. No entanto, esse foi também o gene menos responsivo a todos os tratamentos. O gene *Glyma14g14220* apresentou a menor expressão basal em todas as situações controle. Contudo, foi o gene mais responsivo aos tratamentos com ABA e cloreto de sódio. No tratamento de raízes com ácido salicílico, o gene mais responsivo foi o gene *Glyma17g32100*.

No experimento de infecção da soja com o fungo causador da ferrugem asiática, o gene *Glyma14g14220* foi o que atingiu os maiores níveis de indução nas plantas inoculadas do genótipo suscetível Embrapa-48. Já em plantas do acesso resistente PI561356 inoculadas com o fungo causador da ferrugem asiática, os genes mais induzidos foram *Glyma04g06970* e *Glyma17g32100*. Novos estudos mais detalhados com esses três genes devem ser feitos a fim de se atingir uma compreensão mais profunda de seus papéis biológicos na resposta à ferrugem asiática.

Em relação ao Capítulo II, os embriões resultantes dos eventos que foram submetidos ao protocolo de transformação visando o silenciamento do gene *SbPRP* em soja seguirão sendo transferidos em um prazo máximo de mais 2 meses, tempo suficiente para se ter certeza se estes seguirão ou não o curso normal de conversão a plântulas. Os embriões não convertidos poderão ser confirmados molecularmente como transgênicos e,

então, serem submetidos a cortes histológicos para análise da estrutura de parede celular em microscopia óptica e eletrônica. Conforme discutido no Capítulo II, talvez o silenciamento precoce do gene *SbPRP* seja letal para embriões de soja. Uma estratégia viável, para que o silenciamento do gene *SbPRP* não fosse tão drástico para o desenvolvimento da planta, seria a utilização na transformação da soja de uma construção com promotor induzível, o que permitiria observar as consequências do silenciamento gênico em plantas adultas ou apenas estágios específicos do desenvolvimento.

Para os embriões resultantes dos eventos que foram submetidos ao protocolo de transformação visando à superexpressão do gene *SbPRP* será dada a continuidade no processo de histodiferenciação e conversão de embriões em plântulas, que serão analisadas molecularmente à medida que forem sendo obtidas. Serão feitos experimentos de PCR para confirmar a inserção do T-DNA. Entre os genes que serão averiguados estão o gene *hpt* e o gene *SbPRP*. Para esse último será utilizado um oligonucleotídeo direto, que se anela no promotor 35S, e um oligonucleotídeo reverso, que se anela na região 3' do gene *SbPRP*, evitando, assim, a amplificação do gene *SbPRP* endógeno de soja. Uma vez confirmada a transformação das plântulas serão obtidas as gerações T1, T2 e T3, para, então, serem desafiadas por diversos estresses, tais como seca, alta salinidade e inoculação com o fungo causador da ferrugem asiática.

Com os dados do padrão de expressão de genes *HyPRP* em soja e com a obtenção de plantas transgênicas, superexpressando o gene *SbPRP* ou com esse gene silenciado, será possível uma melhor compreensão da função ainda desconhecida das HyPRPs nessa planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSMANN, S.M. OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends in Plant Science*, 8: 151–153, 2003.
- BAILEY, M.A.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29: 102-108, 1993.
- BAUD, F.; PEBAY-PEYROULA, E.; COHEN-ADDAD, C.; ODANI, S.; LEHMANN, M.S. Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cysteine-rich family. *Journal of Molecular Biology*, 231: 877-887, 1993.
- BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 18: 301-313, 1992.
- BOHLMANN, H.; APEL, K. Thionins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 227–240, 1991.
- BONDE, M.R.; NESTER, S.E.; AUSTIN, C.N.; STONE, C.L.; FREDERICK, R.D.; HARTMAN, G.L.; MILES, M.R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. *Plant Disease*, 90: 708–716, 2006.
- BOUTON, S.; VIAU, L.; LELIEVRE, E.; LIMAMI, A. M. A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. *The Journal of Experimental Botany*, 56: 825-832, 2005.
- BOYER, J. S. Plant Productivity and Environment. *Science*, 218: 443-448, 1982.
- BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor and Wound induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30, 1992.
- BRISSON, L.F.; TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*. 6: 1703–1712, 1994.
- BROMFIELD, K.R. Soybean rust. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1984. 65p. (American Phytopathological Society. Monograph, 11).
- BURSSSENS, S.; HIMANEN, K.; VAN DE COTTE, B.; BEECKMAN, T.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Expression of cell cycle regulatory gene sand

- morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 211: 632–640, 2000.
- CANNON, M.C.; TERNEUS, K.; HALL, Q.; TAN, L.; WANG, Y.; WEGENHART, B.L.; CHEN, L.; LAMPORT, D.T.A.; CHEN, Y.; KIELISZEWSKI, M.J. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 2226-2231, 2008.
- CASSAB, G. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 281-309, 1998.
- CASTONGUAY, Y.; LABERGE, S.; NADEAU, P.; VÉZINA, L.P. A cold-induced gene from *Medicago sativa* encodes a bimodular protein similar to developmentally regulated proteins. *Plant Molecular Biology*, 24: 799–804, 1994.
- CHO, E.K.; HONG, C.B. Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25: 349–358, 2006.
- COOPER, J.L.; TILL, B.J.; LAPORT, R.G.; DARLOW, M.C.; KLEFFNER, J.M.; JAMAI, A.; EL-MELLOUKI, T.; LIU, S.; RITCHIE, R.; NIELSEN, N. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology*, 8: 1471-2229, 2008.
- DEMPSEY, D.A.; SHAH, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 547–575, 1999.
- DEUTCH, C.E.; WINICOV, I. Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *PlantMol.Biol*, 27: 411–418, 1995.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11-15, 1987.
- DROSTE, A.; ZANETTINI, M.H.B.; MUNDSTOCK, E.; HU, C.Y. Susceptibility of Brazilian soybean cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Brazilian Journal of Genetics*, 17: 83-88, 1994.
- DROSTE, A.; PASQUALI, G.; ZANETTINI, M.H.B. Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Molecular Biology*, 18: 51-59, 2000.
- DROSTE, A.; LEITE, P.C.P.; PASQUALI, G.; MUNDSTOCK, E.C.; ZANETTINI, M.H.B. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. *Scientia Agricola*, 58: 753-758, 2001.

- EL-GENDY, W.; BROWNLEADER, M.D.; ISMAIL, H.; CLARKE, P.J.; GILBERT, J.; EL-BORDINY, F.; TREVAN, M.; HOPKINS, J.; NALDRETT, M.; JACKSON P. Rapid deposition of wheat cell wall structural proteins in response to *Fusarium*-derived elicitors. *Journal of experimental Botany*, 54: 85-90, 2001.
- EPSTEIN, E.; NORLYN, J.D.; RUSH, D.W.; KINGSBURY, R.W.; KELLEY, D.B.; CUNNINGHAM, G.A. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, 210: 399–404, 1980.
- EYCKEN, W.; ENGLER, A.; INZÉ, D., MONTAGU, M.; GHEYSEN, G. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites, *Plant Journal*. 9: 45–54,1996.
- FINER, J.J.; MCMULLEN, M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissues. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 27: 175-182, 1991.
- FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W.; MCMULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports*, 11: 323-328, 1992.
- GAMBORG, O.L; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158, 1968.
- GARCIA-BRUGGER, A.; LAMOTTE, O.; VANDELLE, E.; BOURQUE, S.; LECOURIEUX, D.; POINSSOT, B.; WENDEHENNE, D.; PUGIN, A. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 19, 711–724, 2006.
- GARCIA, A.; CALVO, E.S.; KIIHL, R.A. de S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G.E. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 545-553, 2008.
- GIMENO-GILLESIA, C.; LELIÈVRE, E.; VIAUA, L.; MALIK-GHULAMA, M.; RICOULT, C.; NIEBEL, A.; LEDUCC, N.; LIMAMI, A.M. ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago Truncatula* embryo Axis. *Molecular Plant*, 2: 108:119, 2009.
- GREEN, P.B.; ERICKSON, R.O.; BUGGY, J. Metabolic and physical control of cell elongation rate. *Plant Physiology*, 47:423-430, 1971.
- HAHN, M.G.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. The endogenous elicitor, a fragment of

- a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology*, 68: 1161-1169, 1981.
- HAHN, M.; NEEF, U.; STRUCK, C.; GOTTFERT, M.; MENDGEN, K. A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 10: 438-445, 1997.
- HALL, Q.; CANNON, M.C. The cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein RSH is essential for normal embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 1161–1172, 2002.
- HAN, K.K.; MARTINAGE, A. Possible relationship between coding recognition amino acid sequence motif or residue(s) and post-translational chemical modification of proteins. *International Journal of Biochemistry*, 24: 1349–1363, 1992.
- HE, C.Y.; ZHANG, J.S.; CHEN, S.Y. A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by alicyclic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1125–1131, 2002.
- HENRISSAT, B.; POPINEAU, Y.; KADER, J.C. Hydrophobic-cluster analysis of plant protein sequences. A domain homology between storage and lipid-transfer proteins. *Biochemical Journal*, 255: 901-905, 1988.
- HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of National Academic Science*, 25: 11206-11120, 2006.
- HOMRICH, M.S.; PASSAGLIA, L.M.P.; PEREIRA, J.F.; BERTAGNOLLI, P.F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M.A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (*Lepidoptera*, *Noctuidae*) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genetics and Molecular Biology*, 2: 522-531, 2008.
- HONG, J.C.; NAGAOR, T.; KEYJ, L. Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. A comparative analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 1990. 2470–2475.
- HOOYKAAS, P.J.J.; MELCHERS, L.S.; RODENBURG, K.W.; TURK, S.C.H. The *Agrobacterium* virulence system. In; HERMANN, R.G. & LARKINS, B. *Plant Molecular Biology*, 2: 193-204, 1991.

- HUANG, D.; WU, W.; ABRAMS, S.R.; CUTLER, A.J. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2991–3007, 2008.
- JOHN, P. M.; NGUEMA-ONA, E.; CHEVALIER, L.; GLINDSEY, G.G.; BRANDT, W.F.; LEROUGE, P.; FARRANT, J.M.; AZEDDINE, D. Response of the Leaf Cell Wall to Desiccation. in the Resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*. *Plant Physiology*, 141: 651–662, 2006.
- JOSÈ, M., PUIGDOMENECH, P. Structure and expression of genes coding for structural proteins of plant cell wall. *New Phytologist*, 125: 259-282, 1993.
- JOSÈ, M.; PUIGDOMÈNECH, P. Hybrid-prolinerich and related proteins. *Current Topics .Molecular Genetic*, 2: 109–126, 1994.
- JOSÈ-ESTANYOL, M.; PUIGDOMENECH, P. Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology Biochemistry*, 38: 97–108, 2000.
- JOSÈ-ESTANYOL, M.; GOMIS-RUTH, F. X.; PUIGDOMENECH, P. The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiology Biochemistry*, 42: 355-365, 2004.
- KHAN, R.; ALKHAROUF, N.; BEARD, H.; MACDONALD, M.; CHOUIKHA, I.; MEYER, S.; GREFENSTETTE, H; KNAP, H.; MATTHEWS, B. Microarray Analysis of Gene Expression in Soybean Roots Susceptible to the Soybean Cyst Nematode Two Days Post Invasion. *Journal of Nematology*, 36: 241–248, 2004.
- KARIMI, M., INZE, D., DEPICKER, A. Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7: 193-195, 2002.
- KAOWN, D.; HYUN, Y.; BAE, G.O.; LEE, K.K. Factors affecting the spatial pattern of nitrate contamination in shallow groundwater. *Journal of Environmental Quality*, 36: 1479-1487, 2007.
- KINRAIDE, T.B. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. *Plant Physiology*, 118: 513-520, 1998.
- KOCH, E.; EBRAHIM-NESBAT, F.; AND HOPPE, H. H. Light and electron-microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. *Phytopathology*, 106: 302-320, 1983.

- KOORNNEEF, M.; KLOOSTERZIEL, K.M.L.; SCHWARTZ, S.H.; ZEEVAART, J.A.D. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Biochemistry*, 36: 83–89, 1998.
- KRISHNAN, H.B. Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Science*, 45: 454-461, 2005.
- KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306, 2008.
- LAMPORT, D.T.A. The protein component of primary cell walls. *Advances in botanical research*, 2: 151-218, 1965.
- LEE, K.G.; MITCHELL, A.E.; SHIBAMOTO, T. Determination of antioxidant properties of aroma extracts from various beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4817-4820, 2000.
- LENKA, D.; FATIMA C.; LUKÁŠ, F. Analysis of the hybrid proline-rich protein families from seven plant species suggests rapid diversification of their sequences and expression patterns. *BMC Genomics*, 8: 412-428, 2007.
- LI, S.; ASSMANN, S.M.; ALBERT, R. Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biology*, 4: 1732-1748, 2006.
- LI, H.; WANG, Y.; JIANG, J.; LIU, G.; GAO, C.; YANG, C. Identification of genes responsive to salt stress on *Tamarix hispida* roots. *Gene*, 433: 65-71, 2009.
- LIAO, Y.; ZHANG, J.S.; CHEN, S.Y.; ZHANG, W.K. Role of Soybean *GmbZIP132* under Abscisic Acid and Salt Stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 222-230, 2008.
- LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D. D.; RADWAN, O.; *et al.* Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. *The Plant Genome*, 1: 44-54, 2008.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158, 2006.

- MARCHETTI, M.A.; UECKER, F.A.; BROMFIELD, K.R. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. *Phytopathology*, 65: 822-823, 1975.
- MARTINEZ, C.; PONS, E.; PRATS, G. L.E. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant Journal*, 37: 209-217, 2004.
- MARX, J. The roots of plant-microbe collaborations. *Science*, 304: 234-336, 2004.
- MESSINA, M.J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 439S-450S, 1999.
- MEYER, J.D.F.; SILVA, D.C.G.; YANG, C.; PEDLEY, K.F.; MORTEL, C.Z.M.; HILL, J.H.; SHOEMAKER, R.C.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A. GRAHAM, M.A. Identification and Analyses of Candidate Genes for *Rpp4*-Mediated Resistance to Asian Soybean Rust in Soybean. *Plant Physiology*, 150: 295-307, 2009.
- MOLINA, C.; ROTTER, B.; HORRES, R.; UDUPA, S.M.; BESSER, B.; BELLARMINO, L.; BAUM, M.; MATSUMURA, H.; TERAUCHI, R.; KAHL, G.; WINTER, P. *SuperSAGE*: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics*, 9: 553-581, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-498, 1962.
- NELSON, D.E.; REPETTI, P.P.; ADAMS, T.R.; CREELMAN, RA.; WU, J.; WARNER, D.C.; ANSTROM, D.C.; BENSON, R.J.; CASTIGLIONI, P.P.; KUMIMOTO, R.W.; MASZLE, D.R.; DOTSON, S.B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O.J.; HEARD, J.E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of National Academic Science*, 25: 16450-16455, 2007.
- NEMHAUSER, J.L.; HONG, F.X.; CHORY, J. Different plant hormones regulate similar processes through largely non overlapping transcriptional responses. *Cell*, 126: 467-475, 2006.
- NORMAN, C.; HOWELL, K.A.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J.M.; DAY, D.A. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology*, 134: 492-501, 2004.

- PARKER, R.; FLOWERS, T.J.; MOORE, A.L.; HARPHAM, N.V. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1109-1118, 2006.
- PATIL, V.S.; WUIKE, R.V.; THAKARE, C.S.; CHIRAME, B.B. Viability of uredospores of *Phakopsora pachyrhizi* syd. at different storage conditions. *Journal of Maharashtra Agricultural University*, 22: 260-261, 1997.
- PERFECTS, E.; O'CONNELL, J.; GREENE, F.; DOERING, S.; GREEN, R. Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction. *Plant Journal*, 15:273-279, 1998.
- REITER, W. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 536-542, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2344, 1989.
- SAMPEDRO, J.; LEE, Y.; CAREY, R.E.; DE PAMPHILIS, C.; COSGROVE, D.J. Use of genomic history to improve phylogeny and understanding of births and deaths in a gene family. *Plant Journal*, 44:409-419, 2005.
- SASAKI, T.; CHRISTOU, P. Plant biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 2: 117-119, 2004.
- SATO, T.; SATO, S. Infective ability of soybean rust to several leguminous plants. *Soybean Rust News*, 5: 22-26, 1982.
- SCHLUETER, J.A.; DIXON, P.; GRANGER, C.; GRANT, D.; CLARK, C. Mining EST data bases to solve evolutionary events in major crop species. *Genome*, 47: 868-876, 2004.
- SCHMUTZ, J.; CANNON, S.B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D.L.; SONG, Q.; THELEN, J.J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G.D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M.K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H.T.; WING, R.A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R.C.; JACKSON, S.A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463: 178-183, 2010.

- SCHNABELRAUCH, L.S.; KIELISZEWSKI, M.; UPHAM, B.L.; ALIZEDEH, H.; LAMPORT, D.T.A. Isolation of pI4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant Journal*, 9: 477-489, 1996.
- SCHROEDER, J.I.; KWAK, J.M.; ALLEN, G.J. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410: 327-330, 2001.
- SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5:9-23, 1993.
- SILVA, A.M. Avaliação do potencial embriogênico e transformação genética de cultivares-elite de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] utilizando a Biolística e o sistema *Agrobacterium* de maneira integrada. 2005. 0 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador*: Maria Helena Bodanese Zanettini.
- SMITH, N.A.; SINGH, S.P.; WANG, M.B.; STOUTJESDIJK, P.; GREEN, A.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407: 319-320, 2000.
- SOMMER-KNUDSEN, J.; BACIC, A.; CLARKE, A.E. Hydroxy-proline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry*, 47: 483-497, 1998.
- SORIA-GUERRA, R.E.; ROSALES-MENDOZA, S.; CHANG, S.; HAUDENSHIELD, J.S.; PADMANABAN, A.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; HARTMAN, G.L.; GHABRIAL, S.; KORBAN, S.S. Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of *Glycine tomentella* during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes *Theoretical and Applied Genetics*, 40: 1432-2242, 2010.
- STAPLES, R.C. Research on the rust fungi during the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology*. 38: 49-69, 2000.
- STAPLES, R.C. Nutrients for a rust fungus the role of haustoria. *Trends in Plant Science*. 6: 496-498, 2001.
- SUBRAMANIAM, K.; RANIE, J.; SRIJIVASA, B. R.; ACHYUT, M. S.; MAHADEVAN, S. Cloning and sequence of a cDNA encoding a novel hybrid proline-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene*, 141: 207-210, 1994.

- SWOFFORD, D.L. PAUP* 4. *Sinauer Associates, Sunderland, Mass.* 2001.
- TAIZ L. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 585-657, 1984.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ª ed. Porto Alegre: Artemed, 848p, 2009.
- TUAN, F.C.; FANG, C.; ZHI, C. China's Soybean Imports Expected To Grow Despite Short-Term Disruptions. *Electronic Outlook Report from the Economic Research Service*, ocs-04j-01, 2004.
- VAIN, P.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*, 12: 84-88, 1993.
- VIGNOLS, F.; JOSÈ-ESTANYOL, M.; CAPARRÓS-RUIZ, D.; RIGAU, J.; PUIGDOMÈNECH, P. Involvement of a maize proline-rich protein in secondary cell wall formation as deduced from its specific mRNA localization. *Plant Molecular Biology*, 39:945-952, 1999.
- VLOT, A.; DEMPSEY, C.D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206, 2009.
- VOEGELE, R.T.; MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, 159: 93-100, 2003.
- XIONG, L.; ISHITANIM, L.E.E.H.; ZHU J.K. The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold and osmotic stress responsive gene expression. *Plant Cell*, 13: 2063-2083, 2001.
- XIONG, L.; WANG, R.G.; MAO, G.; KOCZAN, J.M. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology*, 142: 1065-1074, 2006.
- XU, Y.; BUCHHOLZ, W.G.; DEROSE R.T.; HALL T.C. Characterization of a rice gene family encoding root specific proteins. *Plant Molecular Biology*, 27: 237-248, 1995.
- WALLING, J.G.; SHOEMAKER, R.; YOUNG, N.; MUDGE, J.; JACKSON, S. Homeology in Paleopolyploid Soybean (*Glycine max*) Revealed Through Integration of Genetic and Chromosome Maps. *Genetics*, 172: 1893-1900, 2006.
- WIEBKE, B.; FERREIRA, F.; PASQUALI, G.; ZANETTINI, M.H.B.; DROSTE, A. Influence of antibiotics on embryogenic tissue and *Agrobacterium tumefaciens* suppression in soybean genetic transformation. *Bragantia*, 65: 543-551, 2006.

- WRIGHT, M.S.; LAUNIS, K.L.; NOVITZKY, R.; DUESIING, J.H.; HARMS, C.T. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In vitro cellular & developmental biology*, 27: 153-157, 1991.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 781-803, 2006.
- YANG, C.Y. Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi*. *Asian Vegetable Research and Development Center*, Bangkok, Thailand, 1991.
- YOUL, J.J.; BACIC, A.; OXLEY, D. Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosyl phosphatidyl inositol membrane anchors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 7921-7926, 1998.
- YU, L.X.; CHAMBERLAND, H.; LAFONTAINE, J.G.; TABAEIZADEH, Z. Negative regulation of gene expression of a novel proline-threonine- and glycine-rich protein by water stress in *Lycopersicon chilense*. *Genome*, 39: 1185-1193, 1996.
- ZHANG, S.; MEHDY, M.C. Binding of a 50kD protein to a U-rich sequence in an mRNA encoding a proline-rich protein that is destabilized by fungal elicitor. *Plant Cell*, 6: 135-145, 1994.
- ZHANG, Y.; SCHLÄPPI, M. Cold responsive EARLI1 type HyPRPs improve freezing survival of yeast cells and form higher order complexes in plants. *Planta*, 227: 233-243, 2007.
- ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 247- 273, 2002.
- ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 6: 441-445, 2003.

Referências da Internet

USDA- United States Department of Agriculture:

<http://www.ers.usda.gov/News/soybeancoverage.htm> (12 de setembro de 2008).

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola:

http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200807_5.shtm (23 de setembro de 2008).

NCBI - National Center for Biotechnology Information:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Department of Energy's Joint Genome Institute and the Center for Integrative Genomics:

<http://www.phytozome.net/soybean.php>

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento:

<http://www.cnptia.embrapa.br/content/aquecimento-global-pode-gerar-prejuizos-de-r-7-4-bi-para-producao-agricola-em-2020-11082008.html> (23 de setembro de 2008).