

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
RESISTÊNCIA A *Meloidogyne javanica* EM SOJA,
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL**

Aguida Maria Rodrigues Morales

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos
Co-orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em Agronomia
(Genética e Melhoramento de
Plantas).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
13 de Fevereiro de 2007

M828a Morales, Aguida Maria Rodrigues
Análise da expressão de genes relacionados à resistência a
Meloidogyne javanica em soja, através da técnica de PCR em tempo
real / Aguida Maria Rodrigues Morales. – – Jaboticabal, 2007
xvi, 85 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientadora: Eliana Gertrudes Macedo Lemos
Banca examinadora: Alexandre Lima Nepomuceno, Jaime Maia
dos Santos, Ricardo Vilela Abdelnoor
Bibliografia

1. PCR em tempo real. 2. Nematóide de galhas. 3. Soja. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

AGUIDA MARIA RODRIGUES MORALES, nasceu em 16 de dezembro de 1981, na cidade de Piraju, SP. Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas no Centro Universitário Filadélfia (UniFil) de Londrina PR, em 2001, vindo a graduar-se em 2004. Durante o curso de graduação, desenvolveu trabalhos de pesquisa em Genética de plantas como bolsista PIBIC/CNPq na Embrapa soja em Londrina, PR e tendo participado de eventos científicos com apresentação de trabalhos. Em março de 2005 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, Área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), Campus de Jaboticabal, SP.

*“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os
capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende
da nossa vontade e perseverança”.*

Albert Einstein

Ao meu querido companheiro e amigo Alan Alves Pereira

*Aos meus pais Vivaldo e Júlia Elizabeth
pelo amor eterno e incondicional.
Aos meus avós Anália, Francisco (vô Chico)
e Manoel (vô Manequinho)
pelo exemplo de vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o dom da vida.

À minha outra cara metade (Ana Paula), exemplo de garra, esforço, meu muito obrigada, por estar sempre me ajudando mesmo de longe, não foi por acaso que Ele me deu você como irmã gêmea.

Aos meus irmãos Vivaldinho e Kiko, obrigada por estarem comigo nessa.

A todos da minha família que direta ou indiretamente colaboraram comigo, essa vitória é de vocês.

Alan Alves Pereira, não tenho palavras para agradecer, você realmente esteve comigo em todos os momentos, nas alegrias, nos experimentos errados (hahaha), estarei sempre ao seu lado. Obrigada Gordinho!!! Adoro você!!!

À aquela que sem dúvida nenhuma tem uma parte de responsabilidade na minha educação, Sandra, muito obrigada por tudo, você é muito importante para mim.

Amanda de Paiva (ermã), Deus realmente colocou você no meu caminho na hora exata, muito obrigada pelo ombro amigo, realmente acho que se existe outras vidas, eu deveria ter sido sua irmã, me orgulho de você!

À Renata Fuganti, meu muito obrigada por tudo, quero ser igual a você quando crescer hahahaha...

À mais nova filhinha, Maria Thereza, mesmo pelo pouco tempo de convívio, adorei te conhecer, sei que nasceu uma grande amizade, e também sei que você vai longe, obrigada por estar ao meu lado no momento mais difícil “defesa”.

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, levarei comigo os seus ensinamentos, sua amizade, e minha admiração, meu muito obrigada por esses quase 5 anos de orientação.

À Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, muito obrigada por me orientar, aprendi muito com este ano de convivência, agradeço pelo colinho de mãe...

Ao Dr. João Flávio pelos ensinamentos, carinho e amizade, meu muito obrigada.

Ao Dr. Waldir Dias pelos ensinamentos de nematologia.

Ao Dr. Álvaro Manoel Rodrigues de Almeida, pelo carinho e amizade.

Ao querido Prof. Dr. Jaime Maia, pela oportunidade de cursar a disciplina de nematologia aplicada e pelas brilhantes correções na minha dissertação, obrigada *Ordinário!!!*

Aos meus grandes amigos e companheiros de Jaboticabal, Daniela Sarti, Marcelo Costa e Daniela Abreu, sentirei muita saudades de vocês, espero voltar sempre para revê-los. Vocês estão guardados no meu coração!

A todos do laboratório de nematologia da Embrapa – Soja em especial ao Claudemir, pela grande ajuda na instalação do experimento.

Ao pessoal do laboratório de biotecnologia vegetal da Embrapa soja, em especial as garotas *Pretenders* Lívia, Paula, Bárbara, Luana, Lizandra, e ao meu mais novo amigo Salvador Lima. Muito obrigada!

À Danielle Gregório obrigada por tudo, pela hospedagem em sua casa.

Aos meus amigos de laboratório e vizinhos, André Passianotto, João Maldonado, obrigada pelo ombro amigo, foi muito bom conviver com vocês...

À Renata Stolf, agradecimentos pela grande ajuda na correção do artigo e elaboração dos gráficos. Obrigada!!!

À Noelle, meus sinceros agradecimentos, saudades da época em que trombávamos no fluxo hahahahaha, espero um dia voltarmos trabalhar juntas, você é especial!

Magda, obrigada por tudo, pelas dicas e principalmente, por me acolher em POA, foi muito bom ter tido a oportunidade de te conhecer melhor, tenho certeza que você vai longe, sucesso!!!

Minha amiga Adriana Polizel, tenho um orgulho imenso de você!!! Sua garra e força me ilumina.

À minha segunda mãe, Vera Lúcia Pierotti (*Fidi*), aquela que me acolheu em todos os momentos no laboratório, JAMAIS, esquecerei você!!!

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa soja, Silvana (Chefinha), César (Cesinolídeo), Nilson Vieira (Tiozinho) e Jairo, muito obrigada pela ajuda.

A todos do laboratório de Microbiologia da Unesp.

As minhas saudosas companheiras de laboratório da Unesp, Silvana, Candida, Eliamar, e Viviane. Obrigada meninas!!!

A Profa. Dra. Lúcia Alves, pelo carinho, amizade, e principalmente pelo “colinho”.

Ao pessoal do SSA da Embrapa Soja, em especial ao Ranieri e Priscila. Vocês são iluminados por DEUS.

Ao programa de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

A Embrapa Soja pela oportunidade de desenvolver a pesquisa na unidade.

A Capes pela bolsa concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Biologia da soja	19
2.1.1. A importância da soja	20
2.2. Breve histórico dos nematóides de galhas	20
2.3. <i>Meloidogyne javanica</i> : nematóide de galha.....	22
2.4. Ciclo de vida.....	23
2.5. Sintomas e danos provocados pelos nematóides	24
2.6. Medidas de controle	26
2.7. Terminologia.....	27
2.8. Mecanismo de resistência de plantas a nematóides.....	29
2.9. Genoma funcional: Conceito e Técnicas	31
2.10. Microarranjos de cDNA	32
2.11. PCR em tempo real.....	33
2.12. Interpretação dos resultados	38
2.13. Genes de interação Planta-Patógenos.....	40
3. METODOLOGIA.....	49
3.1. Produção do material biológico	49
3.1.1. Obtenção do Inóculo	49
3.1.2. Germinação das sementes, transferência das plântulas e inoculação	49
3.2. Coloração de nematóides em tecidos de plantas.....	50
3.2.1. Método da Fucsina ácida	50
3.3. Extração de RNA.....	51
3.3.1. Análise da qualidade do RNA total	52
3.4. Reação da Transcrição Reversa	53
3.4.1. Análise da qualidade do cDNA.....	53
3.5. PCR em Tempo Real	53
3.5.1. Curva de eficiência	53
3.5.2. Quantificação relativa	54
3.5.2.1. Quantificação Relativa nos parentais	55
3.5.2.2. Curva de dissociação	56

3.5.2.3. Análise da expressão gênica nos parentais	56
3.5.3. Quantificação relativa na população.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Confirmação da infecção.....	58
4.2. Extração de RNA de raízes	58
4.3. Reação da Transcrição Reversa	60
4.4. PCR em Tempo Real	61
4.4.1. Curva de eficiência	61
4.4.2. Quantificação relativa	64
4.4.2.1. Quantificação relativa nos parentais e nos indivíduos da população	65
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüências dos <i>primers foward</i> e <i>reverse</i> usado no PCR em tempo real. ...	56
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coloração <i>in situ</i> de <i>M. javanica</i> em raízes de soja.	58
Figura 2. Gel de agarose 1% mostrando a integridade do tRNA extraído de raízes	59
Figura 3. Gel de agarose 1% mostrando a integridade do cDNA dos materiais.....	60
Figura 4. Exemplo de curva de eficiência mostrando resultados no programa <i>SDS</i> (Applied Biosystems, <i>Foster City, CA, USA</i>) relacionando os ciclos de amplificação na abscissa, em relação à magnitude do sinal de fluorescência gerado pela amplificação do gene <i>Xet</i> na ordenada em três diluições crescentes de cDNA.....	62
Figura 5. Curva de dissociação para o gene <i>Xiloglucana endotransglicosilase</i> demonstrando que o produto de amplificação teve sua dissociação entre 75°C e 80°C, uma temperatura correspondente à temperatura de desnaturação do fragmento de interesse.....	63
Figura 6. Corrida eletroforética em gel de agarose 1%, confirmando inexistência de produtos inespecíficos ou dímeros de <i>primer</i> para o gene que codifica para a enzima <i>xiloglucana endotransglicosilase</i>	64
Figura 7. Gráfico gerado pelo programa <i>SDS</i> (Applied Biosystems, <i>CA, USA</i>) que relaciona o número de ciclos da reação de PCR de cada amostra com a magnitude do sinal de fluorescência (ΔRn) para o gene que codifica para a enzima <i>xiloglucana endotransglicosilase</i>	65
Figura 8. Nível de expressão do gene <i>Chalcona sintase</i> em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado	71
Figura 9. Nível de expressão do gene <i>Sth-2</i> em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado	71

Figura 10. Nível de expressão do gene Hs1pro-1 em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado72

Figura 11. Nível de expressão do gene xet em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado72

Figura 12. Nível de expressão do gene Chalcona sintase nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado73

Figura 13. Nível de expressão do gene Sth-2 nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado73

Figura 14. Nível de expressão do gene Hs1pro-1 nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado74

Figura 15. Nível de expressão do gene xet nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado74

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AO
Meloidogyne javanica **EM SOJA, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL**

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de genes de soja envolvidos na resistência ao nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*, utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). Foram avaliadas raízes de soja inoculadas e não inoculadas com o nematóide. Linhagens de soja resistentes (genótipo PI595099) e suscetíveis (cultivar BRS133) e indivíduos resultantes deste cruzamento foram inoculados com juvenis do nematóide. Raízes foram coletadas após um, três e seis dias de inoculação. O RNA total foi extraído e em seguida foi feita a síntese de cDNA, para ser utilizado nas reações de PCR em tempo real. As reações para quantificação do nível de expressão relativa foram preparadas em triplicatas, e um controle endógeno, o gene RNAr 18S também foi incluído. Os resultados mostraram que comparando os indivíduos resistentes com os suscetíveis, os resistentes apresentaram maior expressão dos genes, *Chs*, *Xet*, *Hs1pro-1*, *Sth-2*.

Palavras-chave: PCR em tempo real, nematóide de galhas, soja

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO RESISTANCE TO THE *Meloidogyne javanica* IN SOYBEAN, THROUGH THE TECHNIQUE OF REAL TIME PCR

SUMMARY - This work objective was to analyze the expression of soybean genes involved in the resistance to the root nematode, *Meloidogyne javanica*, using the Real Time PCR (RT-PCR) technique. Soybean roots inoculated and not inoculated with the nematode were evaluated. Resistant soybean lineages (genotype PI595099) and susceptible lineages (cultivate BRS133) and resulting individuals of this crossing were inoculated with juvenile of the nematode. Roots were collected after one, three and six days after inoculation. The Total RNA was extracted and, afterwards cDNA synthesis was made, to be used in the reactions of Real Time PCR. The reactions for quantification relative expression level were prepared in triplicate, and an endogenous control, gene rRNA 18S, was also included. The results showed that comparing the resistant individuals with the susceptible ones, resistants showed higher expression level of the genes, *Chs*, *Xet*, *Hs1pro-1*, *Sth-2*.

Key-words: real time PCR, root nematode, soybean

1. INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, hoje cultivada em grande parte do mundo é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Nos seus primórdios a soja era plantada rasteira e habitava a costa leste da Ásia, principalmente a China. Sua evolução ocorreu de plantas oriundas de cruzamento natural entre duas espécies de soja selvagens, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (EMBRAPA, 2005a).

A soja é uma das principais *commodities* mundiais e seu preço é determinado pela negociação nas principais bolsas de mercadoria, movimentando aproximadamente US\$ 215 bilhões/ano na agroindústria. Estados Unidos, Brasil e Argentina ocupam a primeira posição entre os países produtores de soja (EMBRAPA, 2005a) sendo que em 2004, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de soja, com produção de 50 milhões de toneladas ou 25% da safra mundial, montante menor que o de 2003, quando o País produziu 52 milhões de toneladas e participou com quase 27% da safra mundial, estimada em cerca de 200 milhões de toneladas em 2004.

No contexto das grandes culturas produtoras de grãos, a soja foi a que mais cresceu em termos percentuais nos últimos 32 anos, tanto no Brasil, quanto em nível mundial. De 1970 a 2003, o crescimento da produção global foi da ordem de 333% (CONAB, 2005).

Entre os fatores que interferem na produtividade, estão diversas doenças, destacando-se aquelas causadas por nematóides fitoparasitos. O nematóide de cisto, *Heterodera glycines*, os nematóides de galha, *Meloidogyne spp*), e o nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) são os que apresentam maior potencial de dano a sojicultura (SCHMITT e NOEL, 1984).

Os nematóides prejudicam a agricultura não somente por reduzir as colheitas, isto é, por infligir perdas quantitativas, mas também por perdas qualitativas. Embora os danos quantitativos sejam os que comumente mais atraem a atenção dos agricultores, existem ainda outros tipos de perdas, nem sempre devidamente compreendidas. Assim tanto o número quanto o tamanho dos frutos e tubérculos podem ser reduzidos pela

ação do nematóide (LORDELLO, 1988).

Além dos danos diretos que causam às plantas, reduzindo-lhes o crescimento e podendo torná-las totalmente improdutivas, tais organismos muitas vezes interagem com outros patógenos de solo (fungos e bactérias), facilitando-lhes a entrada nos sistemas radiculares parasitados.

Os fitonematóides não podem ser erradicados, pois possuem mecanismos como a criptobiose, que permitem que os ovos permaneçam viáveis por longos períodos no solo. Assim, várias medidas de controle devem ser utilizadas de modo integrado, visando manter as populações em nível mínimo. Além da rotação de culturas, a utilização de cultivares resistente ou tolerante é uma ferramenta muito importante no controle (FERRAZ, 2001)

A identificação, na cultura da soja, de genes expressos durante a relação parasitária de nematóides e a seleção de genes de resistência ao *M. javanica* são desejáveis para o aprimoramento e obtenção das variedades resistentes (WENDLAND, 2004), e o uso de variedades resistentes é o método de controle mais eficiente, prático e economicamente viável.

WENDLAND et al. (2004) observou através da técnica de microarranjos de DNA, que alguns genes são diferencialmente expressos, em materiais inoculados e não inoculados com *M. javanica* em plantas de soja.

O objetivo do presente trabalho foi verificar o nível de expressão de alguns genes envolvidos na resistência ao nematóide, onde a expressão foi observada pela análise de microarranjos de DNA, somente em plantas resistentes inoculadas, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia da soja

A soja pertence à classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, gênero *Glycine* (WIKIPEDIA, 2007).

A soja é uma planta anual com caule ereto, com grande diversidade quanto ao ciclo de vida, variando de 70 dias para as mais precoces até 200 dias para as mais tardias. O ciclo da planta pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa (VE, VC, V1, V2, V3, Vn) é o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores, e a fase reprodutiva (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8) compreende o período do início da floração até a maturação (COSTA, 1996).

A temperatura ótima para a germinação é em torno de 30º C, podendo variar segundo a cultivar. A emergência é caracterizada pelo aparecimento dos cotilédones acima da superfície do solo, tendo início 5 a 7 dias após a semeadura. Para satisfazer as exigências de temperatura do solo para uma emergência uniforme, a temperatura deve estar em torno de 18º C (COSTA, 1996).

A soja como a maioria das plantas, para florescer, é influenciada pela temperatura e pela duração do período luminoso, o fotoperíodo. A soja é considerada uma planta de dia curto, precisa de uma duração da noite maior que o dia para iniciar o processo de floração e frutificação no momento certo, isto é, após ter atingido o crescimento vegetativo adequado. A grande produção de soja no Brasil hoje, se deve ao desenvolvimento de novas cultivares com fotoperíodo mais longos ficando aptas a diversas regiões.

2.1.1. A importância da soja

Na antiguidade, os chineses usavam a soja como alimento, bem como se utilizavam de muitos remédios dela derivados. Nas primeiras épocas de sua introdução nos Estados Unidos era utilizada como feno para o gado (COSTA, 1996).

O primeiro registro de soja no Brasil é de 1982, quando um agricultor da Bahia a plantou com sementes de origem francesa. A notável expansão no cultivo da soja no Brasil teve lugar, no entanto, nos anos 70, passando a figurar entre os principais produtos capazes de gerar divisas ao país em termos de exportação e tornando-se, a partir de então, fator decisivo ao equilíbrio da balança comercial (SILVA, 2001).

A estimativa para a safra 2006/2007 da cultura da soja, ainda aponta o Brasil como o segundo maior produtor mundial do grão, com uma produção estimada em 54,87 milhões de toneladas e uma produtividade em torno de 655Kg/ha, 10,5% superior à 2005-2006 (CONAB, 2007).

2.2. Breve histórico dos nematóides de galhas

Os nematóides são vermes que atacam as plantas causando doenças e severos danos em diversos órgãos, além de elevados prejuízos aos produtores (CAMPOS, 1999).

Apesar de os nematóides constituírem-se em causadores de doenças das mais antigas em culturas de exploração econômica, muitos deles, altamente patogênicos em culturas, ainda permanecem desconhecidos por muitos agricultores.

Um dos primeiros registros datam de 1855, quando Berkeley, trabalhando na Inglaterra, descobriu que as galhas existentes em raízes de plantas de pepino eram causadas por um nematóide (LORDELLO, 1988).

Em 1872, Greeff encontrou um nematóide causando galha em raízes de gramíneas e o denominou *Anguilulla radiculicola*. Soube-se mais tarde, que se tratava de uma espécie do gênero *Ditylenchus* hoje conhecida como *Ditylenchus radicolus* (LORDELLO, 1988).

Mueller, em 1884, estudou um nematóide encontrado causando galha nas raízes de *Dodartia orientalis* e julgou estar diante do mesmo parasito descrito por Greeff, porém, transferiu-o para o gênero *Heterodera*. Surgiu assim o binômio *Heterodera radiculicola*, que permaneceu até 1932 para designar os nematóides das galhas. Antes disso, em 1879, Cornu havia chamado de *Anguilulla marioni* o nematóide por ele encontrado causando galha em raízes de diversas plantas (LORDELLO, 1988).

No Brasil em 1887, Goeldi, publicou o seu relatório nos Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro (GOELDI, 1987) dizendo tratar-se de nematóides o grupo de parasitos radiculares do cafeeiro e o descreveu como *Meloidogyne exigua*, além de indicar diversas medidas de controle. O nome erigido por Goeldi foi colocado na sinonímia de *H. radiculicola*. Esse nematóide é até hoje um importante patógeno da cafeicultura brasileira (LORDELLO, 1988; CAMPOS, 1997; CAMPOS et al. 1990).

Em 1932, T. Goodey apontou o erro cometido por Mueller e, com base nas Regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica, demonstrou que deveria prevalecer o nome proposto por Cornu em 1879, porém ligado ao gênero *Heterodera*. Dessa forma, passaram os nematóides das galhas a serem denominados *Heterodera marioni* (LORDELLO, 1988).

O gênero *Meloidogyne* passou quase despercebido por muito tempo, sendo revalidado e amplamente aceito apenas a partir de 1949, após a publicação do artigo clássico de B. G. Chitwood intitulado "*Root-knot nematodes: Part I. A revision of the genus Meloidogyne*" (LORDELLO, 1988).

A palavra *Meloidogyne* vem do grego *melon*, que significa melão ou o fruto do cabaceiro, cabaço, mais o sufixo *oeides*, *oid* (semelhante) mais *gyne* (mulher ou fêmea), resulta em fêmea semelhante a uma cabaça. *Meloidogyne* pertence à Classe

Secernentea, Ordem *Tylenchida*, Super-família *Tylenchoidea* e família *Meloidogynidae* (TIHOHOD, 1993).

2.3. *Meloidogyne javanica*: nematóide de galha

As pesquisas sobre Meloidoginoses da soja no Brasil iniciaram-se no princípio da década de 50, com as primeiras observações de campo a respeito do nematicida Dowfume W-10 no controle dos principais nematóides ocorrentes na cultura. Entretanto, a infecção por nematóide de galha em soja, provavelmente passou despercebida, desde o início do cultivo dessa oleaginosa, no Brasil (FERRAZ, 2001).

Originalmente restrito as zonas temperadas, o cultivo da soja expandiu-se de modo gradual, também para muitas regiões subtropicais e tropicais, em especial do Brasil, extremo oriente e, mais recentemente, África (SIKORA et al. 1990). Com isso, a cultura passou a ser alvo comum não apenas de *M. incognita*, mas igualmente de outras duas espécies de nematóides de galha que se encontram muito disseminados nas regiões tropicais, *M. arenaria* e especialmente *M. javanica*.

No Brasil, as espécies *M. javanica* e *M. incognita* de nematóides formadores de galhas, destacam-se pelos danos que causam a soja. Elas têm sido constatadas com maior freqüência no norte do Rio Grande do Sul, sudoeste e norte do Paraná, sul e norte de São Paulo, e sul do triângulo mineiro. Na região central do Brasil, o problema é crescente, com severos danos em lavouras do Mato Grosso do Sul e Goiás (EMBRAPA 2005b).

Nematóides fitopatogênicos são parasitos obrigatórios que provocam danos econômicos de bilhões de dólares à agricultura internacional, por exemplo, as perdas anuais causadas por *Meloidogyne* sp, á cultura da soja, é da ordem de U\$ 2,7 bilhões (TIHOHOD, 2000).

2.4. Ciclo de vida

Seu ciclo de vida completa-se em torno de 22 a 30 dias, sendo diretamente influenciado pela temperatura do solo. Para as espécies *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, as temperaturas ótimas estão entre 25 e 30° C. Acima de 40° C ou abaixo de 5° C, porém, qualquer espécie reduz as suas atividades vitais, podendo cessá-las por completo (FERRAZ, 2001).

O ciclo de vida inicia-se com um ovo, normalmente no estágio unicelular, depositado pela fêmea que se encontra no interior da raiz. Nesse estágio as fêmeas são brancacentas, brilhantes e globosas, apresentando corpo obeso, aberrante, que lembra um saco arredondado (TIHOHOD, 2000). As fêmeas produzem sob condições favoráveis, em média, 400 a 500 ovos, ao longo de um período variável de quatro a seis semanas. Os ovos ficam aglomerados em massa junto ao corpo das fêmeas. Além da proteção relativa que oferece frente a inimigos naturais, tal material atua como sinalizador de eventuais condições externas desfavoráveis. Assim, quando ocorre condição de seca mais prolongada e déficit hídrico no solo, a geléia fica fortemente desidratada, observando-se interrupção ou suspensão temporária do desenvolvimento embrionário no interior dos ovos (FERRAZ, 2001).

O desenvolvimento do ovo inicia-se dentro de poucas horas depois da deposição, resultando em 2, 4,8 e mais células, até a total formação da larva no seu interior (TIOHOD, 2000).

A primeira ecdise ocorre no interior do ovo, transformando-se em juvenis de segundo estágio (J2), que eclodem e passam a migrar no solo à procura de raízes de plantas que possam hospedá-los.

Depois de passar por mais estágios juvenis (J3 e J4), nos quais não se alimentam, atingem a fase adulta. Nas espécies mais importantes, do ponto de vista de dano à agricultura, como *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*, a reprodução dá-se por partenogênese mitótica obrigatória (FERRAZ et al. 1995).

Tal condição implica em importantes aspectos como: a) não há necessidade do concurso do macho para a formação dos ovos, representando vantagem apreciável tanto pela economia de energia que seria gasta na busca do parceiro sexual como pela ausência do mesmo; b) as populações são constituídas normalmente apenas por fêmeas, por sucessivas gerações, aparecendo machos normais ou sexualmente revertidos apenas eventualmente, no geral sob condições de estresse nutricional (LEROI et al. 1998).

2.5. Sintomas e danos provocados pelos nematóides

Os juvenis de segundo estágio penetram na ponta da raiz e pela injeção de substâncias, modificam algumas células localizadas próximas à região dos vasos dando origem às chamadas células gigantes ou nutridoras, que aumentam de tamanho e passam a fornecer alimento ao patógeno que se torna sedentário. Outras células menores, formadas próximas às células gigantes, são produzidas para assimilação e transferência do alimento (FERRAZ et al. 1995). Desse processo resulta que as raízes tornam-se engrossadas na região em que o parasitismo ocorre. Essas raízes diferenciadas são passíveis de fácil visualização a olho nu e constituem as chamadas galhas que apresentam tamanho, forma e localização preferencial no sistema radicular, variáveis em função da espécie de *Meloidogyne* considerada, da planta hospedeira envolvida e do nível de infecção observado (FERRAZ, 2001).

Em soja, as plantas infectadas por *M. arenaria*, *M. incognita* ou *M. javanica* caracterizam-se pela presença de grande número de galhas nas raízes, tanto nas secundárias, como na raiz principal. Deve-se destacar que o ataque da raiz principal não é comum nas Meloidoginoses, porém é bastante freqüente no caso da soja e, em razão disso, nas infecções mais severas, o sistema radicular pode ficar muito atrofiado, reduzido apenas a um aglomerado ou massa de galhas coalescentes nela incitadas. As galhas formadas nas raízes de plantas de soja pelas três espécies referidas podem

atingir grandes dimensões e no interior delas é possível encontrar-se tanto juvenis em desenvolvimento como fêmeas com massas de ovos em números muito elevados.

As células gigantes e as galhas são respostas distintas a um mesmo evento, qual seja a injeção de secreções produzidas pelas glândulas esofagianas do nematóide em células das raízes da planta hospedeira. As células gigantes são essenciais ao desenvolvimento e a reprodução do parasito, porém as galhas não. As galhas, na verdade, constituem apenas bons indicadores da extensão das reações hiperplástica e hipertrófica dos tecidos afetados pelas secreções, podendo ser formadas bem antes que as células gigantes e mesmo na ausência destas (FERRAZ, 2001).

Prejuízos ocasionados por *Meloidogyne* spp. na cultura da soja tem sido relatado nas principais regiões do mundo onde essa espécie é cultivada. Contudo, é difícil de quantificar as perdas causadas, pois a queda no rendimento das lavouras pode variar desde valores poucos significativos até perdas totais, quando as infestações atingem níveis mais elevados.

Nas áreas onde há presença dos nematóides de galha, observam-se manchas em reboleiras nas lavouras, onde as plantas de soja ficam pequenas e amareladas. As folhas das plantas afetadas normalmente apresentam manchas cloróticas ou necrose entre as nervuras, caracterizando a folha “carijó”. Às vezes pode não ocorrer redução no tamanho das plantas, mas por ocasião do florescimento, nota-se intenso abortamento de vagens e amadurecimento prematuro das plantas atacadas. Nas raízes das plantas atacadas observam-se galhas em números e tamanhos variados, dependendo da suscetibilidade, da cultivar de soja e da densidade populacional do nematóide (EMBRAPA, 2005b).

Normalmente, o nematóide de galha é mais freqüente em solos arenosos e leves. Os sintomas e danos são mais severos com déficit hídrico, porém anos muitos chuvosos favorecem sua disseminação (COSTAMILAN, 2000).

No campo, a infecção de plantas por *Meloidogyne* spp., sozinha é muito improvável, já que as bactérias, fungos e vírus estão sempre presentes e claros, interagem, com os nematóides (TIHOHOD, 2000).

2.6. Medidas de controle

O sucesso no controle do nematóide de galha, depende com frequência, da prévia e correta identificação da espécie presente na área. Resumidamente a identificação se baseia nos caracteres morfológicos e morfométricos, principalmente. Entretanto, uma identificação mais apurada, atualmente, não pode prescindir da utilização de dados citológicos, bioquímicos e fisiológicos (TIHOHOD, 2000).

Os métodos de controle de nematóides mais fáceis e disponíveis são:

Métodos culturais (Alqueive, Rotação de cultura, Incorporação de matéria orgânica e Época de plantio, Culturas antagônicas), Métodos genéticos, Métodos químicos.

As recomendações de manejo com rotação de culturas não podem ser feitas antes que a identidade do nematóide predominante em nível de espécie e raça seja conhecida, sob pena de aumento do nível populacional pela escolha das culturas erradas.

O controle dos nematóides de galha na sojicultura brasileira tem sido preocupação constante não apenas dos pesquisadores, mas de técnicos fitossanitaristas e mesmo de produtores mais avançados.

O uso de cultivares resistente pode ter efeitos em cultivos subseqüentes de outras espécies vegetais suscetíveis, que são beneficiadas pela redução populacional do nematóide na área (SILVA, 2001). Essas cultivares possibilitam adequado controle desses nematóides, tanto em sistemas agrícolas de baixo como de alto uso de tecnologia (ROBERTS, 1990).

De acordo com BOERMA & HUSSEY, (1992), algumas vantagens específicas podem ser proporcionadas pelo uso desses cultivares resistentes como: a) suprimir a reprodução da espécie de nematóide em questão; b) reduzir a duração do período de rotação com culturas não hospedeiras para abaixar o nível populacional do nematóide; c) reduzir o risco de contaminação do ambiente; d) não requerer equipamentos

especiais para a utilização; e) possibilitar, no geral, a aquisição das sementes a um custo similar ao das cultivares suscetíveis.

Para várias espécies de plantas cultivadas, como a soja, cultivares resistentes à *Meloidogyne spp.* de importância no Brasil estão disponíveis. Entretanto, alguns fatores que afetam a expressão fenotípica da resistência devem ser considerados, especialmente em regiões tropicais, como a sensibilidade ao calor, a presença de comunidades poliespecíficas de nematóides e variabilidade ao nível de raça ou de patótipo.

2.7. Terminologia

A maioria das plantas são imunes aos nematóides. A imunidade é definida como condição da planta que leva à incapacidade de o nematóide desenvolver-se e reproduzir no interior de seus tecidos, freqüentemente por mecanismo de bloqueio que se manifesta já no início da penetração, inibindo-a (ROBERTS, 1990).

A resistência e a suscetibilidade de plantas referem-se à habilidade evidenciada na supressão do desenvolvimento e da reprodução de determinadas espécies de nematóides. Plantas altamente resistentes possibilitam taxas de reprodução muito restritas dos parasitos, ao passo que as suscetíveis permitem abundante reprodução (SILVA, 2001).

Outra definição importante é a de tolerância. Plantas tolerantes a certas espécies de nematóides sofrem pouca ou nenhuma injúria, mesmo sob alta infecção. Plantas intolerantes, por sua vez, sofrem danos severos. Os atributos de resistência e tolerância são independentes e podem ser herdados de maneira separada e diferenciada. Assim, plantas resistentes podem ser intolerantes, sofrendo injúrias, mesmo sob baixa infecção (SILVA, 2001)

A resistência também pode ser caracterizada pelo número de genes que

controlam a característica, podendo ser monogênica (um único gene – *Meloidogyne incognita*, em tomate), oligogênica (dois a três genes - *Heterodera glycines*, em soja) ou poligênica (vários genes). O modo como a resistência a nematóide é herdada é importante na definição da estratégia a ser adotada para incorporá-la em cultivares comerciais de soja. Na maioria dos casos, a resistência de plantas a nematóides apresentou controle monogênico e oligogênico (BOERMA & HUSSEY, 1992). Os genes de resistência também podem ser classificados com base em seus efeitos na expressão da característica, sendo que os genes maiores apresentam grande efeito e os genes menores, pequenos efeitos (SILVA, 2001).

De acordo com VAN DER PLANK (1963), a resistência pode ser vertical (raça-específica, qualitativa), diferenciando variantes interespecíficas do patógeno, ou horizontal (raça não-específica, quantitativa), efetiva contra todos os variantes do patógeno. A resistência vertical é usualmente conferida por um ou poucos genes maiores, enquanto a resistência horizontal é conferida por vários genes menores (poligênica), com pequenos efeitos aditivos e com herança quantitativa.

A avaliação da resistência é freqüentemente realizada com base na capacidade ou taxa de reprodução (fator de reprodução) dos nematóides nas plantas testadas, apesar de ser este um método indireto de avaliação da doença.

A reprodução é medida procedendo a contagem dos nematóides (ovos, juvenis e/ou adultos, conforme o gênero envolvido) extraídos do sistema radicular e/ou da rizosfera. A seleção de plantas de soja através do fator de reprodução, buscando-se plantas resistentes, também permite a seleção de plantas intolerantes. Nesses genótipos, o ataque dos nematóides impede o desenvolvimento do sistema radicular, tornando-o pequeno e suportando uma população pequena na raiz. Assim, é impossível separar a resistência da intolerância, pois em ambos os casos há pequena taxa de reprodução (SILVA, 2001).

Alguns sintomas também podem ser utilizados para avaliar a resistência das plantas, como é o caso da contagem das galhas radiculares incitadas por *Meloidogyne* spp. Nesse caso é fundamental que haja correlação entre a ausência dos sintomas e a resistência da planta (SILVA, 2001).

Metodologias para a avaliação da resistência de plantas frente a importantes espécies de nematóides estão disponíveis (STARR, 1990) e podem ser praticadas tanto em casa-de-vegetação como no campo, com distintas limitações. Seleções realizadas no campo permitem a avaliação de um grande número de genótipos, mas também requerem um grande número de controles (cultivares de reação conhecida) em diversos pontos da área, pois a distribuição dos nematóides é aleatória formando agregados (SILVA, 2001).

2.8. Mecanismo de resistência de plantas a nematóides.

Os mecanismos de resistência de plantas a nematóides são vários, complexos e, em alguns casos, poucos conhecidos (HUANG, 1985).

A resistência pode decorrer de fatores que estão presentes antes que o nematóide penetre a raiz da planta (HUANG, 1985). Nesta categoria, incluem-se os efeitos repelentes e/ ou nematicida de determinadas substâncias químicas presentes no exsudato radicular de algumas plantas. O exemplo mais conhecido é a substância α -*Tertienil*, produzida pelos cravos de defuntos (*Tagetes* spp.).

A expressão da incompatibilidade ou resistência depois da penetração (infecção) é basicamente a mesma observada para outros patógenos. KAPLAN & DAVIS, (1987) dividiram a resposta da resistência em duas fases: determinativa e expressiva. A primeira envolve a detecção do nematóide por células da planta, numa reação do tipo elicitor-receptor. O elicitor provavelmente é produzido na glândula esofagiana do nematóide e é injetado no tecido do hospedeiro através do estilete. Esse reconhecimento gera, direta ou indiretamente, um sinal responsável pela reação de hipersensibilidade, envolvendo ativação de genes, síntese de mRNA e transcrição de DNA. A próxima fase expressiva inclui uma sucessão de eventos de regulação gênica e modificações bioquímicas que são iniciadas com o processo de sinalização, prevenindo o desenvolvimento do nematóide. Nessa fase, não há desenvolvimento normal dos

sítios de alimentação, que se degeneram. Dessa forma, em raízes de plantas resistentes, poucos nematóides desenvolvem-se até adultos, há formação de número maior de machos e quando eventuais fêmeas reproduzem, o fazem com taxas mais baixas de fecundidade (SILVA, 2001).

Após a penetração, os nematóides ainda podem ser afetados por compostos tóxicos já presentes nos tecidos das plantas (resistência bioquímica pré-formada). Correlação positiva entre os teores de compostos fenólicos e a resistência de tomate a *M. incognita* já foi observado em maior concentração em cultivares resistentes de tomate (HUANG, 1985).

Algumas espécies de plantas, especialmente leguminosas, podem rapidamente sintetizar compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, chamados fitoalexinas, em resposta à penetração de nematóide (HUANG, 1985).

Fitoalexinas são, em sua maioria, compostos lipofílicos, cujas propriedades químicas permitem cruzar a membrana plasmática e atuar dentro da célula. Não apenas a lipofilicidade, mas outras características como maior número de hidroxilas, o caráter ácido da molécula e a presença de substituintes, como grupos fenólicos, conferem maior toxicidade às fitoalexinas. Sua ação ocorre em concentrações de 10^{-6} a 10^{-4} M (SMITH, 1996).

Nos processos normais de infecção da planta, o estímulo para a síntese de fitoalexinas provém do invasor e normalmente é representado por moléculas liberadas ou secretadas por ele. Essas moléculas podem ser carboidratos, lipídeos ou proteínas e são conhecidas como eliciadores (HAHN, 1996).

Em soja, observaram-se maior produção e acúmulo da fitoalexina gliceolina na cultivar Centennial, resistente a *M. incognita*, quando inoculada com esse parasito. Já na cultivar Pickett 71, suscetível, houve menor acúmulo. Entretanto, quando Centennial foi inoculada com *M. javanica*, ao qual é suscetível não houve acúmulo expressivo de gliceolina (KAPLAN et al., 1980a e 1980 b). *M. incognita* parece ser bem mais sensível a ação dessa fitoalexina do que *M. javanica*, que suportou elevadas concentrações em experimento *in vitro* (HUANG, 1985).

Reações bioquímicas também seguem o mesmo padrão observado para outros

tipos de doenças, como o aumento da atividade de determinadas enzimas, como catalases, peroxidase e polifenoloxidase (ROBERTS et al. 1998)

2.9. Genoma funcional: Conceito e Técnicas

Nos últimos anos ocorreram muitos avanços na tentativa de clonar, seqüenciar e mapear o genoma de vários organismos. No entanto pouco se sabe ainda a respeito da função biológica, expressão e regulação destes genes seqüenciados (PANDA, 2003).

As ferramentas de genômica funcional permitem diversas formas de abordagem que promovem respostas para algumas questões básicas que incluem, quando o gene é expresso, onde o produto está localizado, quais as interações que o gene faz e que fenótipo resulta quando ele é mutado. A genômica funcional aspira responder sistematicamente questões para todos os genes no genoma, ao contrário das abordagens convencionais que estudam um gene por vez (STENINMETZ, 2004).

Vários métodos são capazes de detectar e quantificar os níveis de expressão dos genes, incluindo *Northern blots* (ALWINE et al. 1977), *S nuclease protection* (BERK & SHARP, 1977), *differential display* (LIANG & PARDEE, 1995), *sequencing of cDNA libraries* (ADAMS, 1991) e *serial analysis of gene expression* (SAGE) (VELCULESCU, et al. 1995) microarranjo de DNA (SCHENA et al. 1995) e PCR em tempo real (BUSTIN, 2000).

Estes recursos auxiliam no estabelecimento da correlação dos genomas à sua função biológica pelo estudo das moléculas, transcritos ou proteínas, que estes genomas estão expressando.

2.10. Microarranjos de cDNA

Inicialmente descritos em 1995 por SCHENA *et al.* microarranjos de DNA de alta densidade têm sido de grande impacto no estudo da expressão diferencial de genes. Este método é conhecido como microarranjo ou microchip de DNA, no qual é possível posicionar aproximadamente 250.000 oligonucleotídeos ou 1.000 cDNAs por centímetros quadrado de superfície sólida (VODINH, 2001).

Microarranjos de DNA são comumente utilizados para monitorar a expressão de genes arranjados em populações de mRNA, para detectar seqüências polimórficas de DNA ou mutações no DNA genômico. O formato dos arranjos de DNA tem a vantagem sobre outros métodos de hibridização (*Southern ou Northern blot*) que utilizam membranas flexíveis, pois reduzem a difusão da área necessária para o complexo de hibridização da sonda encontrar DNAs arranjados complementarmente.

Simplificadamente, um dos objetivos de um experimento de microarranjo é identificar os transcritos que são alterados entre amostras de RNA de diferentes tipos celulares, ou mesmo de um único tipo celular ou tecido em diferentes situações, e determinar a magnitude das diferenças observadas (YUEN *et al.* 2002).

A vantagem do microarranjo é que a técnica é empregada em várias aplicações como monitoramento da expressão gênica, detecção de mutações, análises polimórficas, mapeamento e estudos relacionados à evolução e detecção de OGM (SCHENA & DAVIS, 1999; CONCEIÇÃO *et al.* 2006).

A tecnologia de microarranjos de DNA pode acelerar o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, pois uma grande fração do genoma pode ser analisada simultaneamente e o agrupamento dos dados pode identificar grupos de genes que implicam na ativação ou repressão de diversas vias reguladoras. Também permite a análise da seqüência temporal da indução e repressão da transcrição, um pré-requisito para a determinação da ordem dos eventos que seguem à interação entre o patógeno e a célula hospedeira. Seguindo o padrão da expressão gênica do hospedeiro em

diferentes momentos, é possível elucidar quais genes hospedeiros são estimulados ou reprimidos durante o curso da infecção (KATOMAEDA et al. 2001).

2.11. PCR em tempo real

O avanço da ciência sobre a compreensão dos genes trouxe para a rotina do laboratório de genética, ferramentas que permitem o diagnóstico em nível molecular. Uma aplicação especialmente útil para a PCR é a clonagem de determinado fragmento de DNA, que pode ser um gene e o conhecimento do DNA codificante obtido a partir da molécula de RNA, o que permite o estudo da expressão de genes. O RT-PCR é o mais sensível e mais flexível dos métodos de quantificação (WANG & BROWN, 1999). É um método para detecção do mRNA de baixo-abundância, obtido freqüentemente das amostras limitadas do tecido. Entretanto, é uma técnica complexa, há uns problemas substanciais associados com sua sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade e, como um método quantitativo, está sujeito a problemas inerentes em PCR (BUSTIN, 2000).

O desenvolvimento de químicas modernas e plataformas de instrumentação que habilitam descoberta de produtos de PCR em tempo real conduziu a adoção difundida do PCR em tempo real como o método de escolha para quantificar a mudança na expressão dos genes durante os últimos anos. Além disso, o PCR em tempo real se tornou o método preferido por validar resultados obtidos de análises de microarranjos de DNA e outras técnicas que avaliam expressão de gene em larga escala (AMBION, 2006).

HIGUCHI e colaboradores (1992) foram os primeiros pesquisadores que tentaram detectar em tempo real, produtos amplificados via PCR sem a necessidade de se abrir os tubos da reação. Estes pesquisadores criaram um sistema no qual brometo de etídio era adicionado aos tubos de reação. Este sistema também incluía um termociclador que irradiava as amostras com luz ultravioleta e a detecção da

fluorescência era feita em uma câmera acoplada a um computador. A cinética do acúmulo de fluorescência durante a termociclagem era diretamente relacionada com o número inicial de cópias de DNA. Assim, quanto menor o número de ciclos necessários para produzir uma fluorescência detectável, maior o número de seqüências alvos. Deste modo, como a fluorescência do brometo aumentava conforme ele se ligava a moléculas de DNA fita dupla, um aumento na fluorescência durante os ciclos indicava uma amplificação positiva, e este sinal fluorescente era facilmente monitorado externamente. Plotando-se o aumento da fluorescência versus o número de ciclos, este sistema produzia um panorama completo do processo de PCR, da quantidade de produto acumulado em um determinado ciclo.

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Thresbold*. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

Em todas as reações de PCR em tempo real um controle endógeno é utilizado. Este controle é uma referencia ativa, ou seja, a quantificação de um mRNA alvo pode ser normalizada por diferenças na quantidade de RNA total adicionada a cada reação. Os genes utilizados como controle são normalmente genes constitutivos com expressão em todos os tecidos, fases de desenvolvimento e situações do estudo em questão (VANDESOMPELE et al. 2002).

Os controles endógenos mais freqüentemente usados são Albumina (GOLDSWORTHY et al. 1993), gliceraldeido-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) (TANG et al. 1996) e RNAr18S.

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema óptico para excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um programa para aquisição de dados e análise final da reação. Estas máquinas, disponíveis de diversos fabricantes, diferem na capacidade da amostra, no método da excitação e na sensibilidade total. Há também diferenças nos programas para o processamento dos dados.

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em Tempo Real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos.

- *SYBR®Green*

O *SYBR®Green* se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador emite uma fluorescência verde. As vantagens da utilização do *SYBR®Green* são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. O *SYBR®Green* não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena. Entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o *SYBR®Green*. As moléculas não-ligadas do *SYBR®Green* apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do *SYBR®Green* podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, as moléculas do *SYBR®Green* vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é

monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real no ciclo seguinte na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do *SYBR®Green* são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa da extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM et al.1999).

- *TaqMan®*

TaqMan® é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→ 3'da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão.

A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (HEID et al.1996).

O sistema *TaqMan®* utiliza um processo denominado FRET (transferência de energia ressonante por fluorescência). O FRET é uma interação distância-dependente entre os estados excitados eletrônicos de duas moléculas *dyes* (Fluoróforos), na qual íons excitados são transferidos de uma molécula doadora (*dye repórter*) a uma molécula receptora (*dye quencher*) sem a emissão de um fóton. Assim quando as moléculas *dyes* estão próximas, ocorre transferência de energia e não ocorre emissão de fluorescência, que só acontece quando os fluoróforos estão distantes espacialmente, inibindo a transferência de energia e permitindo a emissão da fluorescência (GIULIETTI

et al. 2001). A reação com a *TaqMan*® é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de seqüências específicas (HOLLAND et al.1991).

Esse tipo de químico apresenta um custo elevado, pois a síntese de sondas específicas é necessária. No entanto, este sistema permite sua utilização em reações *multiplex*, ou seja, reações onde mais de um par de *primers* pode ser usado, detectando diferentes seqüências alvos.

- *Molecular beacons*

Molecular beacons são oligonucleotídeos usados como sondas de fitas simples que formam uma estrutura secundária entre as extremidades 5'e 3', chamada de *haste-e-loop*. O *loop* contém uma seqüência que é complementar à seqüência-alvo e a *haste* é formada pelo anelamento das seqüências complementares que estão localizadas nas extremidades. Um fluoróforo é covalentemente ligado no final de uma extremidade e um *quencher* é covalentemente ligado no final a outra extremidade. Os oligonucleotídeos *molecular beacons* não emitem fluorescência quando estão livres em solução. Entretanto, quando hibridizam com a fita de DNA contendo a seqüência-alvo, as sondas assumem uma mudança conformacional tornando-a capaz de emitir fluorescência (AMBION, 2006).

Na ausência de alvos os oligonucleotídeos não emitem fluorescência, pois o *quencher* está próximo fluoróforo captando energia. No momento em que o *molecular beacons* encontra o seu alvo, ocorre a hibridização resultando em uma reorganização conformacional, onde o fluoróforo se dissocia do *quencher*, emitindo assim fluorescência (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Este sistema também utiliza o FRET, no entanto, uma diferença importante entre o sistema *TaqMan* e o método de *molecular beacons*, é que neste a sonda permanece intacta durante a amplificação do produto de PCR, se ligando novamente a seqüência alvo a cada ciclo.

Os *molecular beacons* podem ser sintetizados com diferentes cores de fluoróforos, possibilitando ensaios que necessitam detectar diferentes alvos em uma mesma reação. São altamente específicos permitindo discriminar seqüência - alvo que diferem entre si por apenas um nucleotídeo substituído. São sondas ideais, no ensaio diagnóstico para identificação genética.

- *Scorpions*

Essas sondas são *primers* seqüência-específicas que detectam produtos de PCR utilizando apenas um único oligonucleotídeos. A sonda *Scorpions* mantém uma configuração de *haste-loop* quando não hibridizada. Na extremidade 5' está ligado o fluoróforo e na 3' o *dye quencher*. Esta extremidade contém uma seqüência complementar ao produto da extensão do *primer*. Esta seqüência é ligada à extremidade 5' do *primer* específico por um monômero não aplicável, chamado *blocker*. Este *blocker* impede a extensão do *primer* pela *Taq polimerase*. (AMBION, 2006).

Após a extensão, durante a amplificação, a sonda de seqüência específica é capaz de se ligar a sua seqüência complementar no DNA molde. Este evento de hibridização abre a estrutura de *haste-loop*, separando os *dyes*, iniciando a emissão de fluorescência, e a detecção dos produtos amplificados.

2.12. Interpretação dos resultados

Antes do cálculo do nível de expressão é feita uma curva de dissociação (*melting curve*) para verificar possíveis erros ou contaminações durante a reação. Um gráfico plotando o número de ciclos pela temperatura de dissociação é então gerado. Esta dissociação do fragmento de interesse deve ocorrer em uma temperatura de

aproximadamente 80°C, caso ocorra em temperaturas inferiores deve-se considerar a existência de dímeros de *primers*, uma possível contaminação, ou ainda uma baixa proporção de GC. A interpretação dos resultados é feita através de um programa (*Sequence Detection*) acoplado à máquina de PCR em Tempo Real.

São empregadas duas estratégias comumente para quantificar os resultados obtidos por PCR em tempo real; o método de curva padrão e o método comparativo Ct.

- **Método de curva padrão**

Neste método, uma curva padrão é construída primeiro de uma concentração de RNA conhecida. Esta curva é então usada como um padrão de referência por medir a informação quantitativa de concentrações de RNA desconhecidas. Embora possam ser usados padrões de RNA, a estabilidade deles pode ser uma fonte de variabilidade nas análises finais. O uso de absolutamente padrões quantitativos de RNA ajudarão em gerar dados de número de cópia absolutos.

Na curva padrão, se obtém o valor da inclinação da reta (chamado de *slope*) e a partir deste valor calcula-se a eficiência dos *primers* na reação da seguinte forma: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$. A eficiência tanto do gene alvo quanto do controle endógeno devem ser similares e bem próximo de 100% (APPLIED BIOSYSTEMS, 1997).

- **Método comparativo Ct**

Este método compara os valores de Ct das amostras de interesse com um controle ou calibrador; como uma amostra não tratada ou tecido normal. Ambos valores de Ct do calibrador e da amostra de interesse são normalizados com o controle endógeno.

Para o [cálculo de delta][delta]^{Ct} ser válido, as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno devem ser aproximadamente iguais. Isto pode ser estabelecido olhando como [delta]Ct varia com diluição do *template*.

Para calcular o nível de expressão gênica de um gene de interesse são considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$ e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$. A partir daí calcula-se o nível de expressão pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.13. Genes de interação Planta-Patógenos

Apesar das aparências, as plantas não aceitam de modo passivo as agressões que sofrem de vírus, bactérias, insetos, nematóides e demais organismos ou de agentes não-biológicos, como radiação, temperaturas extremas, poluição e outros. Para sobreviver durante sua evolução, elas desenvolveram mecanismos de respostas a danos e doenças, acionados assim que reconhecem a agressão. Saber como os vegetais se protegem é essencial para obter, através da bioengenharia, variedades agrícolas mais resistentes, o que pode aumentar a produção e a qualidade dos alimentos (MARGIS-PINHEIRO et al. 1999).

Apesar dos grandes avanços das pesquisas nos últimos anos sobre a indução de resistência em plantas, algumas questões ainda permanecem sem respostas, como, por exemplo, como ocorre a translocação dos sinais e qual sinal é translocado no floema; e com certeza os grandes avanços na biologia molecular deverão colaborar com a solução de tais questões e estimular o uso da indução de resistência como um eficiente método de controle de fitopatógenos.

A identificação de genes expressos durante a relação parasitária de nematóides associados à cultura da soja e a seleção de genes de resistência a *M. javanica* são desejáveis para aprimoramento e obtenção de variedades resistentes, e o uso das

mesmas é o método de controle mais eficiente, prático e economicamente viável (WENDLAND, 2004).

WENDLAND (2004) mostrou através da técnica de microarranjos de DNA, que alguns genes são diferencialmente expressos, em materiais inoculados e não inoculados com *M. javanica* em plantas de soja, assim, os genes Chalcona sintase (CHS) (nº de acesso no *GenBank* CA851897), xiloglucana endotransglicosilase (XET) (nº de acesso no *GenBank* A1495154), o gene da proteína de resistência à *Heterodera schachtii* (HS1pro-1) (nº de acesso no *GenBank* AF280812) e a enzima *Sulfotransferase hydroxysteroid preferring 2* (STH-2) (nº de acesso no *GenBank* BF008742) tiveram a expressão induzidas somente em plantas resistentes inoculadas.

Plantas respondem ao ataque de patógenos induzindo a síntese de vários compostos de defesa. O tempo para a percepção do patógeno é o centro de defesa da planta, e envolve o reconhecimento gerado pelo elicitor ou liberado pelo patógeno que em troca estimula a sinalização da cascata conduzindo a um aumento da resistência (MONTESANO et al. 2003)

A sinalização da defesa é mediada por compostos como etileno (ET), ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA), que regula a expressão de genes de defesa da planta e eventualmente conduz a produção de moléculas de defesa tais como fenilpropanóides (DIXON e PAIVA, 1995), fitoalexinas (SMITH, 1996) e proteínas relacionadas a patogenicidade (PR). O sucesso de defesa de planta depende da produção final que resulta da interação de vários fatores, inclusive de características genéticas e fisiológicas de ambos na interação planta-patógeno, como também de condições ambientais.

- **Chalcona sintase**

Estudos realizados na Alemanha, com cultivares de batata atacados pelo fungo da requeima, levaram à descoberta de que as plantas resistentes acumulavam

substâncias inibidoras do crescimento do fungo, o que não ocorria em cultivares de batata suscetíveis à doença (MARGIS-PINHEIRO et al. 1999). Estas substâncias foram denominadas fitoalexinas (do grego *Phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) e suas descobertas causaram profundas mudanças no conceito de resistência a plantas a patógenos.

Fitoalexinas são compostos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular e sintetizados pelas plantas em respostas a estresses físicos, químicos ou biológicos. São capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos, sendo a taxa de acúmulo dependente dos genótipos do hospedeiro e/ou patógeno (CAMPOS et al. 2003).

Fitoalexinas são, na sua maioria, compostos lipofílicos, cujas propriedades químicas permitem cruzar a membrana plasmática e atuar dentro da célula. Não apenas a lipofilicidade, mas outras características como maior número de hidroxilas, o caráter ácido da molécula e a presença de substituintes, como grupos fenólicos, conferem maior toxicidade às fitoalexinas. Sua ação ocorre em concentrações de 10^{-6} a 10^{-4} M (SMITH, 1996).

Acredita-se que a maioria das plantas sejam capazes de sintetizar fitoalexinas, mas algumas a fazem de maneira muito lenta, permitindo que o microorganismo complete a infecção antes que haja o acúmulo dessas substâncias em quantidades suficientes para inibi-lo. Para diversas interações planta-patógeno foi demonstrado que a velocidade de acúmulo das fitoalexinas é um dos fatores decisivos para o estabelecimento ou não da infecção. Nos processos normais de infecção da planta, o estímulo para a síntese de fitoalexinas provém do microorganismo invasor e normalmente é representado por moléculas liberadas ou secretadas por ele. Essas moléculas podem ser carboidratos, lipídeos ou proteínas e são conhecidas como eliciadores (HAHN, 1996).

Não existem dúvidas quanto ao fato da síntese de fitoalexinas integrar o arsenal de defesas químicas de que as plantas dispõem contra o ataque de patógenos. Porém, a relação direta e exclusiva entre a produção de fitoalexinas e a resistência a patógenos foi demonstrada apenas para algumas espécies cultivadas. O caso clássico é a ervilha

(*Pisum sativum*), onde a infecção da planta só ocorre por linhagens do fungo *Nectria haematococca* capazes de destoxificar a *pisatina*. A fitoalexina produzida por ela (VAN ETEN et al. 1995). Transformações genéticas no fungo e que levam à perda da enzima que desmetila a *pisatina*, tornam as plantas de ervilha resistentes ao ataque desse microrganismo.

Chalcona sintase (CHS) é a enzima chave na biossíntese dos fenilpropanóides (fitoalexinas), sendo ela responsável pela condensação de três moléculas de *manonyl-CoA* com *cinamoyl-CoA* produzindo chalcona, uma molécula de 25 carbonos, utilizada pelas enzimas subseqüentes na rota dos chamados fenilpropanóides (ABE et al. 2001).

Enquanto CHS está presente em todas gimnospermas e angiospermas, a distribuição e especificidade da enzima variam dramaticamente em diferentes espécies, dentro de tecidos diferentes, e a tempos diferentes durante o ciclo de vida de uma planta. Devido a esta diversidade bioquímica, a maioria das plantas mantém cópias múltiplas de genes de chs que são expresso em vários tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento. Alguns destes genes são expressos constitutivamente enquanto outros são induzidos por estresse ambiental ou ferimento (AUSTIN & NOEL, 2003).

Embora algumas propriedades biológicas ou medicinais são limitadas à subdivisões de classe de flavonóides específicas, mais freqüentemente uma atividade particular ou uma atividade fisiológica pode ser representada pela variada distribuição de produtos naturais de diferentes subclasses de flavonóide. Em outras palavras, espécies diferentes freqüentemente chegam a soluções fitoquímicas diferentes para o mesmo ou semelhantes problemas biológicos na forma de produto de flavonóide variados que exibem diferentes combinações de componentes químicos (DIXON & PAIVA, 1995). Este tipo de diversidade biológica também acontece dentro de espécies individuais, e é esperado conferir uma vantagem adaptável à planta.

- *Sulfotransferase hydroxysteroid preferring 2 (Sth-2)*

Sth-2 é membro de uma família pequena de genes ativados por patógenos na batata. Foi primeiramente identificado pelo acumulo rápido de fitoalexinas em discos de tubérculos de batata tratados com ácido araquidônico, um elicitor da síntese de fitoalexina isolado do fungo *Phytophthora infestans* (MARINEAU et al. 1987).

A função do produto do gene Sth-2 é desconhecida e diversas comparações com outros genes com função conhecida não revelaram semelhança significativa. Genes homólogos ao Sth-2 tem sido identificado em ervilha (CHIANG e HADWIGER 1990), salsa (SOMSSICH et al. 1998), e feijão (WALTER et al. 1990). A presença de genes homólogos ativados por infecção em outras espécies de plantas indica que o Sth-2 é um fato importante da resposta de plantas à doenças.

O gene Sth-2 codifica para uma proteína de 17kDa que é acumulada na maioria dos tecidos depois de estresse como ferimento ou infecção (MATTON & BRISSON, 1989). CONSTABEL & BRISSON (1992) mostraram que embora a função do gene Sth-2 não seja conhecida, a inoculação de tecidos de tubérculos com baixa concentração de esporos avirulentos do fungo *Phytophthora infestans* induziram a rápida acumulação da proteína STH-2 em relação quando inoculado com níveis altos de esporos virulentos.

Acredita-se que o gene Sth-2 esteja envolvido na reação de hipersensibilidade em plantas e faz parte de uma classe distinta de proteínas relacionadas a patogenicidade (MATTON & BRISSON, 1989).

A reação de hipersensibilidade (resistência local) é caracterizada pela morte de células situadas nos locais por onde o agressor entra no vegetal. Com isso, a planta impede o acesso do patógeno a células vizinhas, limitando a infecção. Embora essa reação tenha sido identificada há quase 100 anos, não está claro se sua característica primária (morte celular) tem alguma função direta na resistência ou é consequência de mecanismos de sinalização que de fato levariam aos eventos capazes de inibir a ação dos patógenos (MARGIS-PINHEIRO et al. 1999).

Embora a reação de hipersensibilidade já tenha sido bastante estudada em

doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, ela parece estar também relacionada intimamente com a resistência a nematóides (HUANG, 1985).

Comuns a todas as plantas e a diferentes patógenos, os aspectos fisiológicos da reação de hipersensibilidade incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula, além de síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa (PR).

A morte dos tecidos durante a reação de hipersensibilidade tem sido atribuída a toxicidade de produtos do metabolismo do patógeno, devido aos mecanismos de morte programada das células ou em função das espécies ativas de oxigênio (BALARDIN, 2006).

- **Xiloglucana endotransglicosilase (Xet)**

A parede da célula da planta é uma rede complexa de celulose, hemiceluloses, pectinas e proteínas estruturais (MCCANN & ROBERTS, 1994). As hemiceluloses são os polissacarídeos que geralmente têm capacidade de se ligar por pontes de hidrogênio à celulose, a xiloglucana é a hemicelulose mais abundante da parede das dicotiledôneas (FRY, 1989).

Nas plantas dicotiledôneas as xiloglucanas parecem ser constituídas principalmente por unidades de monassacarídeos (XG9) e heptassacarídeos (XG7) resistentes à ação da enzima *endo-b*-(1→4)-glucanase (HAYASHI, 1989). Em menor quantidade ocorrem também penta, deca e undecassacarídeos.

As xiloglucanas são construídas em blocos de 6 a 11 açúcares, tendo três principais variantes estruturais: fucogalacto-XyG, arabino-XyG e GAX com estruturas variadas. Encontram-se associadas à celulose por pontes de hidrogênio (HAYASHI, 1989), desempenhando funções estruturais de união de microfibrilhas de celulose adjacentes (FRY, 1989; HAYASHI, 1989).

A enzima xiloglucana endotransglicosilase está envolvida em processos de modificação da parede celular das plantas, incluindo síntese e degradação de compostos. A XET catalisa a quebra intramolecular de polímeros de xiloglucanas, principal composto de proteínas estruturais da parede celular como hemicelulose, celulose, pectinas e outras. Esta enzima também permite a expansão da célula sem danificar sua estrutura, provavelmente alterando a estrutura da parede pela adição de novos polímeros de xiloglucanas (CAMPBELL & BRAAM, 1999).

Embora o mecanismo detalhado da reação da XET seja desconhecido, um recente trabalho demonstrou que provavelmente exista uma ligação covalente entre a XET e o polímero de xiloglucana como um intermediário (PRITCHARD et al. 1993).

Primeiramente foi proposto a XET atuar na expansão da célula. Realmente, há uma boa correlação entre níveis altos de atividade da XET e expansão de célula. Em ambas raízes e folhas de milho, a atividade da XET é mais alta em regiões em expansão. Como ocorre a diminuição da taxa de expansão, diminui a taxa da atividade da XET; porém, a atividade ainda é detectada prontamente em regiões que completou o crescimento (PRITCHARD et al. 1993).

Em resposta a perturbação mecânica como toque, as propriedades mecânicas das plantas são freqüentemente alteradas. Estas alterações podem resultar em mudanças na composição da parede da célula, incluindo o aumento da incorporação de polímeros de xiloglucana pela ação da XET.

As xiloglucanas são sintetizadas no aparato de Golgi e levadas à parede celular através das vesículas (WHITE et al. 1993). Xiloglucanas recém sintetizadas podem ter baixo peso molecular quando comparadas com polímeros de xiloglucanas de parede mais velhas.

Há papéis potenciais adicionais para a atividade da XET. Atividades da enzima e nível de seu mRNA foram aumentados durante o amadurecimento (REDGWELL & FRY, 1993) conduzindo a proposta que XETs poderiam funcionar na degradação celular durante amadurecimento de fruta.

A reconstrução da parede da célula é um pré-requisito importante para muitos processos vitais da planta, como germinação, crescimento, amadurecimento do fruto,

abscisão, diferenciação vascular e respostas a patógenos (CARPITA & MCCANN, 2000).

Mudanças estruturais nos componentes da parede da célula são provocadas através da modificação enzimática, e as enzimas responsáveis por essa modificação têm papel importante durante a morfogenia da célula. Um das interações fundamentais na parede primária das células das dicotiledôneas é a associação íntima de celulose com as xiloglucanas nas células (VIERHUIS et al. 2001).

As xiloglucanas endotransglicosilase são tipicamente codificadas por famílias multigênicas. Por exemplo, mais de 30 genes Xet foram identificados no genoma da *Arabidopsis thaliana*. Baseados em similaridade de seqüências, três a quatro subgrupos diferentes foram reconhecidos (ROSE et al., 1996). A análise da expressão mostra que os membros da família gênica da Xet são individualmente regulados, o qual sugere que as enzimas operam em diferentes tecidos ou durante diferentes processos.

Na ausência da compreensão de análise bioquímica, não se sabe ainda se a expressão em um tecido específico ou a divisão em subgrupos refletem diferenças na especificidade do substrato ou no modo de atuação de diferentes izoenzimas da XET.

- **Hs1pro-1**

Plantas estabeleceram um sistema imune inato baseado em gene dominante de resistência (gene de R). Produtos de genes de resistência são implicados dentro de ambos reconhecimento do elicitor codificado através de genes de avirulência (Avr) e em ativação de componentes em vias de sinalização. Quando produtos dos genes R e Avr se interagem um com outro de maneira direta ou indireta, são induzidas respostas que é freqüentemente associada à localização rápida e morte celular que finalmente restringe o crescimento e reprodução do patógeno na planta (DANGL e JONES, 2001).

Recentemente vários genes de resistência foram isolados de uma gama de espécies de dicotiledônea e monocotiledônea que conferem resistência para uma

variedade de patógenos de planta e intensivamente estudou os níveis genéticos e moleculares. Genes R de diversas espécies codificam proteínas que contenham um domínio N-terminal variável, seguido por um sítio putativo de ligação de nucleotídeo (NBS) e repetições ricas em Leucina (LRRs) (ELLIS et al. 2000; DANGL & JONES, 2001).

Acredita-se que a especificidade do reconhecimento do elicitor é determinada pelo domínio LRR (ELLIS et al. 2000) enquanto que o terminal N, provavelmente junto com o domínio NBS, participa ativando os componentes da transdução de sinal que conduzem para respostas específicas de resistência a patógenos (FEYS & PARKER, 2000). Porém muito pouco se sabe sobre a regulação transcricional de gene R de plantas em células.

Tipicamente, os nematóides de cisto induzem e mantêm o sincício multinuclear no cilindro vascular das plantas. Esta estrutura de alimentação extensa, resultada da degradação da parede da célula entre as mesmas do parênquima vascular e a fusão subsequente do protoplasto (SOBCZAK et al. 1997), é a única fonte de nutrientes para os nematóides em desenvolvimento.

A alteração fisiológica e celular envolvendo a formação e diferenciação da estrutura de alimentação do nematóide requer alta coordenação da expressão e regulação dos genes (DAVIS et al. 2000).

O gene Hs1pro-1 é um gene de resistência específico ao nematóide de cisto *Heterodera schachtii* encontrado em beterraba. Acredita-se que o Hs1PRO-1 pertença a uma classe de genes de resistência (R), uma vez que a proteína putativa codificada apresenta regiões ricas em leucina e um domínio transmembrana típicos de proteínas de resistência (THURAU et al. 2003). Em raízes suscetíveis ao nematóide, esta proteína de resistência promove a necrose celular no local de infecção, rompendo as células de alimentação do nematóide, promovendo a degradação do sincício e a morte dos juvenis (HOTLMANN et al. 2000). No entanto, nenhuma homologia foi encontrada em bancos de dados de genes de seqüências conhecidas, de modo que sua função específica permanece desconhecida (THURAU et al. 2003).

3. METODOLOGIA

3.1. Produção do material biológico

3.1.1. Obtenção do Inóculo

M. javanica foi multiplicado em soja [*Glycine Max* (L.) Merrill], cultivar Embrapa 20 (DOKO RC) e mantida em vasos em casa de vegetação. Raízes com galhas foram coletadas dos vasos e a extração de ovos foi feita segundo HUSSEY E BARKER (1973).

A suspensão de ovos livres de impurezas foi colocada em câmara de eclosão e mantida em temperatura de 26°C. A cada 24 horas os juvenis (J2) eram recolhidos e a suspensão era armazenada em geladeira até o momento do uso.

Depois de recolhidos os juvenis (J2), a contagem do número de indivíduos foi feito colocando 1 mL da suspensão em uma placa marcada em quadrantes (câmara de Peters) em seguida contou-se os juvenis.

3.1.2. Germinação das sementes, transferência das plântulas e inoculação

Sementes das linhagens parentais de soja resistentes (genótipo PI595099) e suscetíveis (cultivar BRS 133) ao nematóide *M. javanica* e indivíduos resultantes deste cruzamento, três resistentes (JF7056, JF7002, JF7027) e três suscetíveis (266-S, 256-S, 259-S) foram colocadas para germinar em câmara de germinação.

Após sete dias as plântulas com radículas maiores que 2 cm foram transferidas para tubetes contendo areia em casa de vegetação. Em seguida as plântulas foram

inoculadas utilizando uma micropipeta com uma suspensão de aproximadamente 680 Juvenis (J2) por planta.

Raízes de todos os materiais inoculados ou não foram retiradas dos tubetes seguindo-se os tratamentos propostos de um, três e seis dias após a inoculação. Após serem lavadas as raízes eram cortadas próxima a região meristemática e armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA. Uma amostra de cada tratamento também foi separada no momento da coleta para coloração com fucsina ácida.

3.2. Coloração de nematóides em tecidos de plantas

3.2.1. Método da Fucsina ácida

A coloração das raízes seguiu o método proposto por BYRD et al. (1983).

As raízes foram bem lavadas, para retirar toda areia aderida, tomando cuidado para não danificar a raiz. Em seguida as raízes foram cortadas em vários fragmentos de aproximadamente 2 cm. Estes fragmentos eram colocados em um béquer contendo NaClO (Hipoclorito de sódio 2%) e deixados em repouso durante seis minutos, com agitação ocasional. As raízes foram retiradas e lavadas em água corrente por 30 a 40 segundos para retirada dos resíduos de hipoclorito. Esta etapa foi realizada com auxílio de uma peneira com tela de *nylon 32 mesh*. Em seguida as raízes foram deixadas novamente em um *Becker* contendo água por mais 15 minutos. Após os 15 minutos as raízes foram transferidas para um outro recipiente contendo 30 mL de água e 1 mL de corante (fucsina). Posteriormente as raízes foram colocadas em um recipiente contendo glicerina.

Após a coloração os fragmentos das raízes foram colocados em lâminas e observados em microscópio, para confirmar a infecção das plantas com os juvenis de

M. javanica.

3.3. Extração de RNA

Para a extração de RNA foi utilizada a metodologia descrita por CHOMCZNSKI & SACCHI (1987), utilizando-se o reagente *Trizol* (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA*) que é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanadina.

Aproximadamente 0,1 g de tecido de raiz foi colocado em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, em seguida foi adicionado 1 mL de *Trizol* previamente aquecido em banho Maria a 55°C. Posteriormente o material foi agitado por 1 min no *vórtex* e centrifugado levemente somente para o tecido/*Trizol* ficar na parte inferior do tubo.

O material foi em seguida incubado a 55°C por 2 min, e posteriormente colocado em gelo por 1,5 h. O material foi então centrifugado a 16.000 x g a 4°C durante 20 min. Enquanto ocorria a centrifugação colocou-se 200 µL de clorofórmio em um novo tubo para cada amostra. Após a centrifugação, o sobrenadante foi colocado no tubo com clorofórmio e os resíduos foram descartados.

Sobrenadante mais clorofórmio foram incubados a temperatura ambiente (22-25°C) por 2 min e posteriormente centrifugado a 16.000 x g a 4°C durante 30 min. O sobrenadante foi colocado em um novo tubo onde se adicionou 1/3 do volume com LiCl 8M seguido de agitação no *vórtex*.

O material foi em seguida incubado em freezer -80°C por 1 h. Após a incubação centrifugou-se o material a 16.000 x g em 4°C por 30 min. Em seguida removeu-se cuidadosamente o sobrenadante tentando não agitar ou remover o precipitado, descartando-se o sobrenadante em seguida.

Adicionou-se a cada tubo 400 µL de 75 % EtOH, e em seguida o tubo foi girado levemente para cima e para baixo. Posteriormente centrifugou-se o material a 16.000 x

g em 4°C por 5 min. O sobrenadante foi removido completamente tomando-se cuidado para não remover partes do precipitado.

Adicionou-se 100 µL de água DEPC (*Dietil pirocarbonato*) (autoclavada várias vezes) e dissolveu-se o material com batidas leves dos dedos nas pontas do tubo; em seguida foi adicionado 10 µL de Acetato de Sódio (3M) e 100 µL de Isopropanol, onde o tubo foi girado levemente para cima e para baixo e posteriormente incubado a -80°C por 30 min.

Colocou-se o tubo em banho maria (37°C) por alguns minutos (1-3 min) e em seguida centrifugou-se a 16.000 x g a 4°C por 15 min e posteriormente removeu-se o sobrenadante cuidadosamente e adicionou-se 400 µL de 70% EtOH. Posteriormente o material foi centrifugado a 16.000 x g a 4°C por 15 min.

Removeu-se o sobrenadante cuidadosamente e o tubo com o precipitado ficou secando por 10 min na bancada. Após a secagem adicionou-se a cada tubo 50 µL de água ultrapura. Aqueceu a solução em 37°C por 10 min para dissolução total do precipitado.

Após os procedimentos foi realizada a quantificação do RNA total em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas 260nm e 280nm. O Armazenamento das amostras foi feito em ultra freezer em -80°C.

3.3.1. Análise da qualidade do RNA total

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo tampão TBE1x. A cuba foi tratada com *RNAse Away* (InvitrogenTM *Life technologies* cat 10328-011). Foi adicionado no gel 2 µL de RNA com 2 µL de tampão de amostra (sacarose 40% mais azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TBE (1x) (Tris/ácido bórico/ EDTA) durante 40 min a 80v.

A quantificação do RNA total foi realizada em fluorímetro (*Gene Quant pro* Pharmacia Biotech) e como branco, foi utilizada H₂O DEPC.

3.4. Reação da Transcrição Reversa

Dez μL de RNA total ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 2 μL de *primer* Oligo dT ($10\ \mu\text{M}$) foram adicionados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL). Em seguida a solução foi aquecida a 80°C por 3 min, e resfriada em gelo por 1 min.

Posteriormente foram adicionados ao tubo 6 μL de tampão primeira fita (5x), 4 μL dNTP's (2,5 mM); 2 μL DTT (0,1 M); 2 μL enzima *Transcriptase reversa* (Moloney Murine Leukemia Vírus- M-MLV) (Invitrogen – *Life Technologies*) e 4 μL H_2O DEPC, totalizando um volume final de 30 μL .

A reação foi conduzida a 37°C por 1 hora e em seguida inativada a 65°C por 10 min. O produto da reação foi em seguida armazenado a 4°C e usado posteriormente para as reações de PCR em tempo real.

3.4.1. Análise da qualidade do cDNA

A integridade do cDNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1%). Foi adicionado no gel 2 μL de cDNA com 2 μL de tampão de amostra (sacarose 40% mais azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TBE (1x) durante 40 min a 80v.

3.5. PCR em Tempo Real

3.5.1. Curva de eficiência

Visando determinar a concentração ideal para a reação de PCR, uma curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA (1x, 10x, 100x). A amplificação foi realizada utilizando o *kit Platinum Sybr Green qPCR Supermix UDG* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), conforme recomendação do fabricante.

A curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA para todos os pares de *primers*, CHS F/R, XET F/R, Hs1pro-1 F/R, STH-2 F/R (Tabela I), visando determinar a concentração ideal para a reação de quantificação relativa. As reações de RT-PCR foram preparadas em triplicatas, e um controle endógeno, o gene rRNA 18S (nº de acesso no *Genbank* XO2623.1) também foi incluído.

A reação foi incubada por 50°C por 2 min e seguida por 95 °C por dois minutos. A ciclagem foi em 45 ciclos com temperaturas de desnaturação 95 °C por 15 segundos, anelamento a 62 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos.

A curva de eficiência fornece o valor da inclinação da reta (*slope*) e a partir deste valor calcula-se a eficiência de amplificação na reação de acordo com a fórmula: $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$. A eficiência tanto do gene alvo quanto do controle endógeno devem ser similares e bem próximo de 100% (APPLIED BIOSYSTEMS, 1997).

Após cada reação de PCR em tempo real foi realizado uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% contendo Brometo de Etídio (10 mg/mL) para visualizar os produtos de amplificação e se não haviam dímeros de *primers* ou amplificações inespecíficas. Foi aplicado ao gel 10 µL da reação com 2 µL de tampão de amostra (sacarose 40% e azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TBE (1x) durante 1 hora a 120 v.

3.5.2. Quantificação relativa

A quantificação relativa descreve mudanças de nível de expressão de um gene de interesse em uma amostra teste, relacionando esses valores a uma amostra utilizada como calibrador. Este calibrador pode, por exemplo, ser uma amostra que não

recebeu o tratamento em estudo, ou uma amostra no tempo zero de tratamento (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A quantificação relativa permite uma acurada comparação dos níveis de expressão de gene de interesse em uma amostra em relação à outra amostra.

3.5.2.1. Quantificação Relativa nos parentais

A quantificação relativa foi realizada com *bulks* de cDNA dos três tratamentos da linhagem resistente e suscetível inoculadas e não inoculadas com o nematóide, resultando em quatro *bulks*, BRS133 inoculado e não inoculado, e PI595099 inoculado e não inoculado com um, três e seis dias.

As reações de PCR em Tempo Real foram feitas com a diluição de 100x, utilizando o *kit Platinum Sybr Green qPCR Supermix UDG* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), conforme recomendações do fabricante.

Os genes testados foram, chalcona sintase (CHS) (nº de acesso no *GenBank* CA851897); xyloglucana endotransglicosilase (XET) (nº de acesso no *GenBank* AI495154), o gene da proteína de resistência à *Heterodera schachtii* (HS1pro-1) (nº de acesso no *GenBank* AF280812) e a enzima sulfotransferase hydroxysteroid preferirng 2 (STH-2) (nº de acesso no *GenBank* BF008742) (Tabela 1).

As reações de quantificação relativa foram feitas utilizando o mesmo controle endógeno e parâmetros descritos para a curva de eficiência.

Tabela 1. Seqüências dos *primers forward* e *reverse* usado no PCR em tempo real.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
chs	5' CAGGCACAAAGGGCAGAAG3'	5' GGTTTGGTGGGTTTGCAGTT3'
sth-2	5' CTATGGGAGTCACAACCTTTACACA3'	5' GGCCTTGAACATGCGTGAT3'
Hs1pro-1	5' TCACGCCGCACCTTCTGT3'	5' TGAGTTGAGGAAGACGGAGATAGTAG3'
xet	5' GACCTCTGGCTCTGGATTTCG3'	5' AGGAATGAGTACTTGTTTGA3'

3.5.2.2. Curva de dissociação

Após a quantificação relativa foi realizado uma curva de dissociação onde verifica-se formação de dímeros de *primers*, amplificação inespecíficas, possíveis erros e contaminações. Na curva de dissociação a temperatura é baixada gradativamente. A reação foi incubada por 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por mais 15 segundos.

No final da amplificação um gráfico plotando o número de ciclos pela temperatura de dissociação foi então gerado.

3.5.2.3. Análise da expressão gênica nos parentais

Todas as análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se o programa *Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems) e como calibrador, a expressão do parental resistente não inoculado PI595099.

Para calcular o nível de expressão de um gene de interesse são considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$ e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$. A partir daí calcula-se o nível de expressão pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5.3. Quantificação relativa na população

A quantificação relativa nos indivíduos da população foi realizada com *bulks* de cDNA das três datas de coleta (1,3,6 dias após inoculação) por indivíduos genotipados resistentes e suscetíveis inoculados e não inoculados com o nematóide, resultando em doze *bulks*: 266-S inoculado e não inoculado, 256-S inoculado e não inoculado, 259-S inoculado e não inoculado, JF7027 inoculado e não inoculado, JF7002 inoculado e não inoculado, JF7056 inoculado e não inoculado com um, três e seis dias.

As reações de quantificação relativa nos indivíduos população e sua respectiva análise foram feitas utilizando o mesmo controle endógeno e parâmetros descritos anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Confirmação da infecção

Pela coloração das raízes pode-se confirmar que a inoculação com os juvenis (J2) do nematóide foi eficiente, pois em todos os materiais inoculados, resistentes e suscetíveis, nas três datas de coleta, a presença do nematóide foi observada (Figura 1).

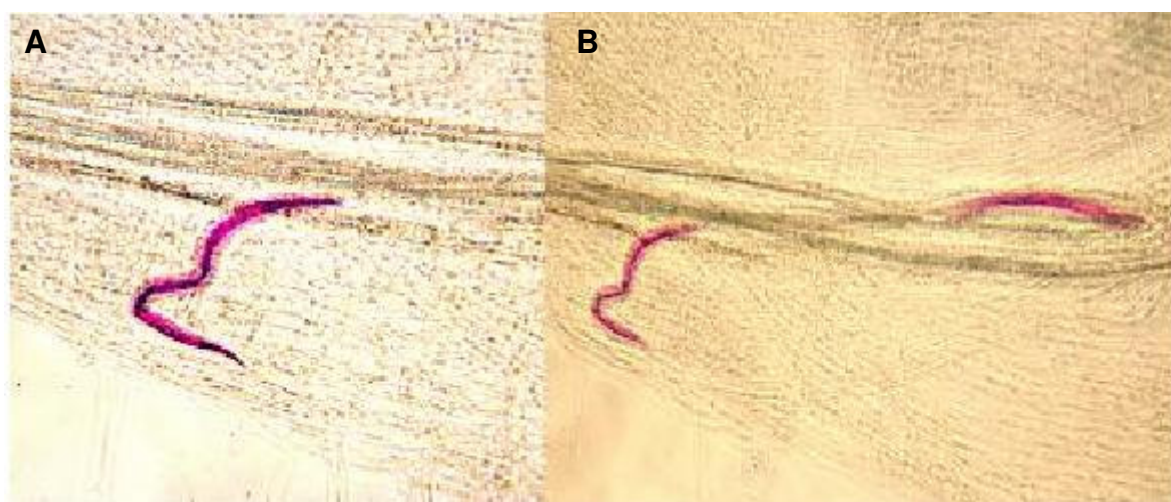


Figura 1. Coloração *in situ* de *M. javanica* em raízes de soja.

A) parental resistente PI595099.

B) suscetível BRS 133, ambas inoculadas com o J2 do nematóide *M. javanica*.

4.2. Extração de RNA de raízes

Foram obtidos em média 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA por amostra de raiz sendo que aproximadamente 1 a 2 % do RNA obtido corresponde a mRNA (DEYHOLOS e GALBRAITH, 2001).

As amostras de RNA total foram checadas em gel de agarose 1% (Figura 2) e nas absorvâncias de 260/280 nm sendo o valor médio obtido de 1,7.

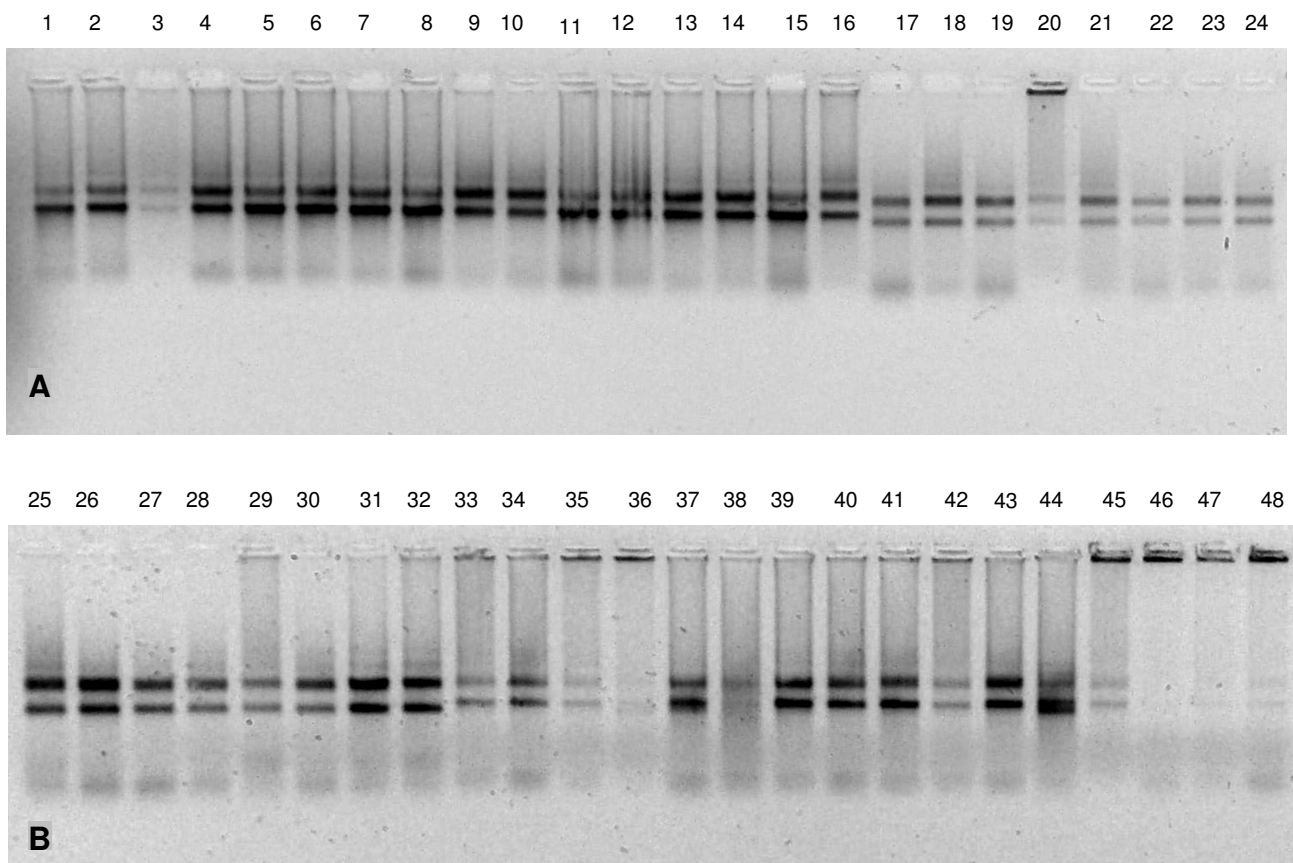


Figura 2. Gel de agarose 1% mostrando a integridade do tRNA extraído de raízes

- A)** RNA total extraído de materiais resistente PI595099, JF7056, JF7027, JF7002 respectivamente, com 1 dia de inoculação (Amostras 1 a 4); com três dias de inoculação (amostras 5 a 8); com seis dias de inoculação (amostras 9 a 12), com 1 dia sem inoculação (amostras 13 a 16); com três dias sem inoculação (amostras 17 a 20); com seis dias sem inoculação (amostras de 21 a 24).
- B)** RNA total extraído de materiais suscetíveis BRS 133, 266-S, 259-S, 256-S respectivamente, com 1 dia de inoculação (Amostras 25 a 28); com três dias de inoculação (amostras 29 a 32); com seis dias de inoculação (amostras 33 a 36), com 1 dia sem inoculação (amostras 37 a 40); com três dias sem inoculação (amostras 41 a 44); com seis dias sem inoculação (amostras de 45 a 48).

No perfil eletroforético do RNA em gel de agarose 1%, foram visualizadas duas bandas bem definidas na maioria das amostras. Este perfil das amostras na eletroforese demonstra que o RNA está intacto (BIRREN, 1997). Para as amostras que não apresentaram este perfil uma nova extração foi feita

4.3. Reação da Transcrição Reversa

O perfil eletroforético do cDNA produzido a partir do tRNA extraído das raízes dos materiais estudados pode ser observado na Figura 3. Na maioria das amostras foi possível observar um “arraste”, mostrando que o cDNA está intacto. Amostras que não apresentaram este perfil de cDNA tiveram as reações de *transcriptase reversa* refeita.

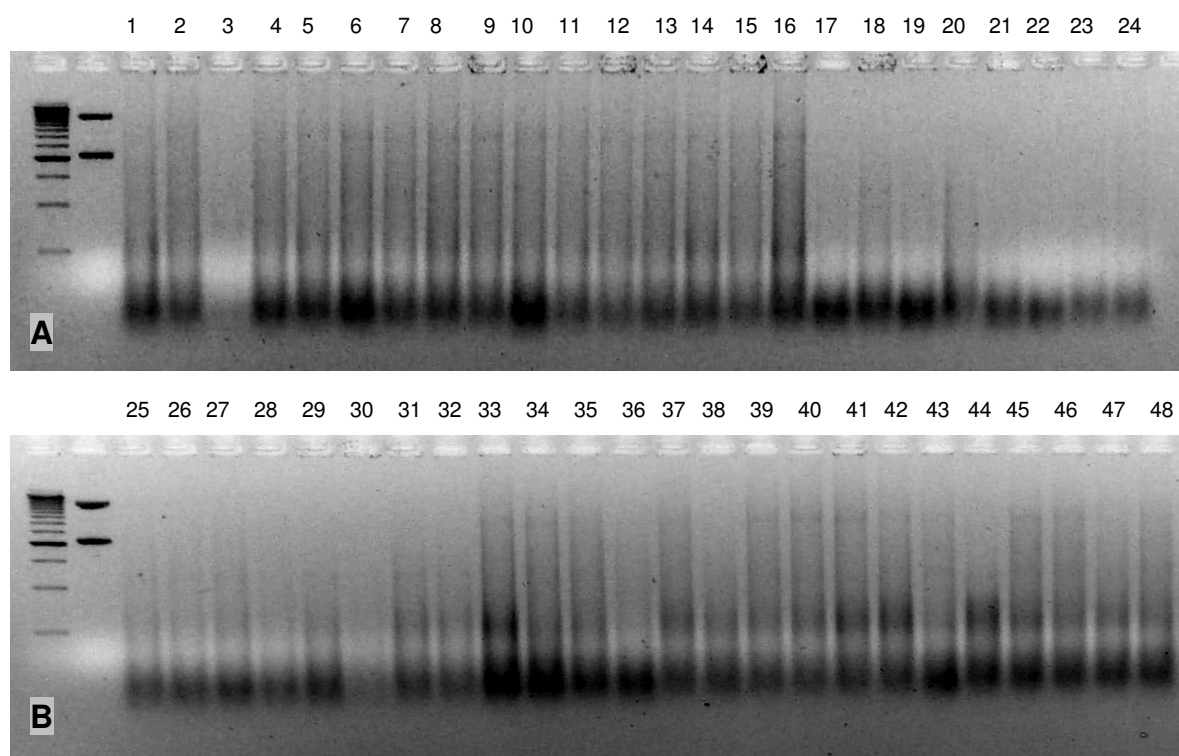


Figura 3. Gel de agarose 1% mostrando a integridade do cDNA dos materiais

- A)** cDNA dos materiais resistente PI595099, JF7056, JF7027, JF7002 respectivamente, com 1 dia de inoculação (Amostras 1 a 4); com três dias de inoculação (amostras 5 a 8); com seis dias de inoculação (amostras 9 a 12), com 1 dia sem inoculação (amostras 13 a 16); com três dias sem inoculação (amostras 17 a 20); com seis dias sem inoculação (amostras 21 a 24).
- B)** cDNA dos materiais suscetíveis BRS 133, 266-S, 259-S, 256-S respectivamente, com 1 dia de inoculação (Amostras 25 a 28); com três dias de inoculação (amostras 29 a 32); com seis dias de inoculação (amostras 33 a 36), com 1 dia sem inoculação (amostras 37 a 40); com três dias sem inoculação (amostras 41 a 44); com seis dias sem inoculação (amostras 45 a 48).

4.4. PCR em Tempo Real

4.4.1. Curva de eficiência

Uma curva padrão de níveis de fluorescência detectáveis (ΔC_t) foi gerada à partir de concentrações conhecidas de amostras de cDNA nas diluições 5x, 10x, 100x para cada gene sendo estudado. A curva padrão relaciona o nível de fluorescência com a quantidade de DNA amplificado.

Pode-se observar que conforme a concentração do cDNA diminui, aumenta o número de ciclos necessários para se alcançar um nível de fluorescência detectável, ou nível crítico de *threshold* (ΔC_t). Isto ocorre, pois quanto menor a quantidade do cDNA molde presente na amostra inicial de amplificação maior o número de ciclos necessários para se detectar certos níveis de fluorescência (Figura 4).

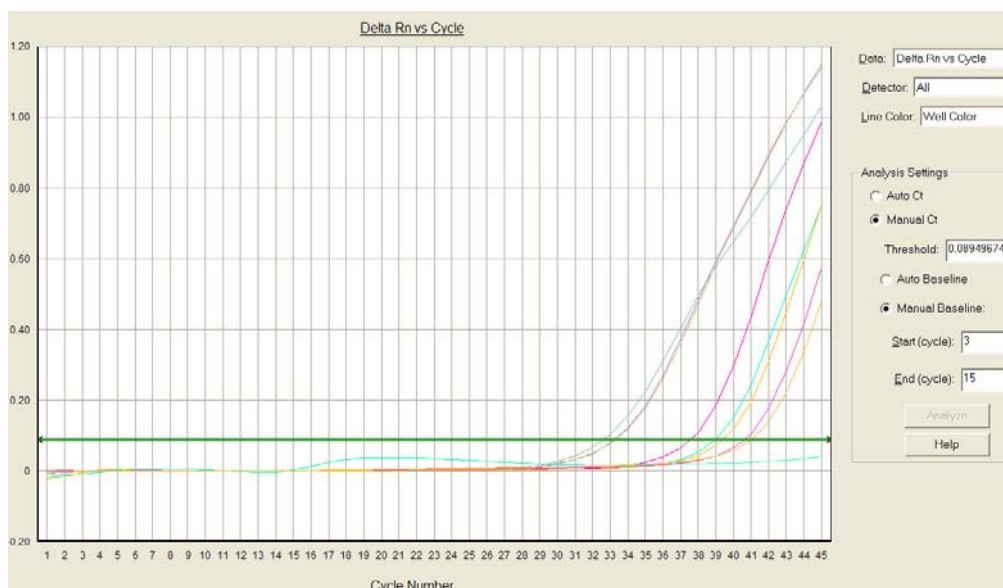


Figura 4. Exemplo de curva de eficiência mostrando resultados no programa *SDS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) relacionando os ciclos de amplificação na abscissa, em relação à magnitude do sinal de fluorescência gerado pela amplificação do gene Xet na ordenada em três diluições crescentes de cDNA.

A curva de eficiência foi feita para os outros genes alvo, Chs, Sth-2, Hs1pro-1, e com o controle endógeno rRNA 18S (resultados não mostrados), visando a identificação da melhor concentração a ser utilizada na quantificação relativa.

Para a análise dos níveis de expressão dos genes, foi escolhido como concentração de trabalho a diluição de 100x. A eficiência dos genes em estudo e do controle endógeno ficaram acima de 90%. Quando o gene alvo e o gene endógeno têm eficiência 100%, atribui-se um valor 2. A eficiência obtida foi de aproximadamente 1,8 (APPLIED BIOSYSTEMS, 1997).

Este valor é utilizado para se calcular o nível de expressão do gene de interesse normalizado em relação ao controle endógeno e relativo a uma amostra controle calibradora ($\Delta\Delta C_t$), ou seja, os níveis de expressão relativa do gene de interesse calculado pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Após a amplificação por PCR em Tempo Real, cada produto de amplificação foi analisado por uma curva de dissociação certificando que, para cada gene e tratamento, o produto amplificado não apresentou bandas inespecíficas e/ou formação de dímeros de *primer*, conforme exemplificado na Figura 5 para o gene Xet.

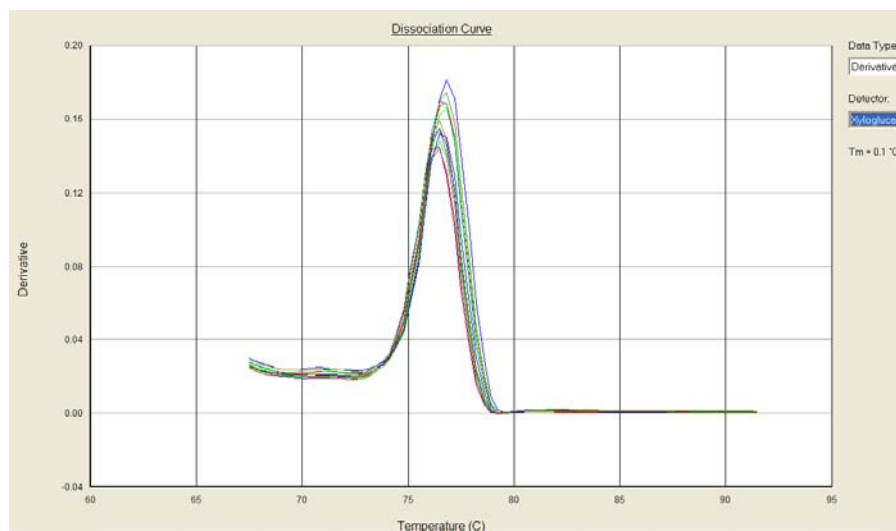


Figura 5. Curva de dissociação para o gene Xiloglucana endotransglicosilase demonstrando que o produto de amplificação teve sua dissociação entre 75⁰C e 80⁰C, uma temperatura correspondente à temperatura de desnaturação do fragmento de interesse.

Os produtos de amplificação para cada gene em estudo também foram checados em gel de agarose 1% para avaliar se houve amplificação única dos fragmentos correspondentes aos genes em estudo e do gene endógeno (18sRNA). Para todos os genes em estudo não foi observado formação de produtos inespecíficos ou formação de dímeros de *primer* conforme exemplificado pela eletroforese feita para o gene que codifica para a enzima xiloglucana endotransglicosilase (Figura 6).

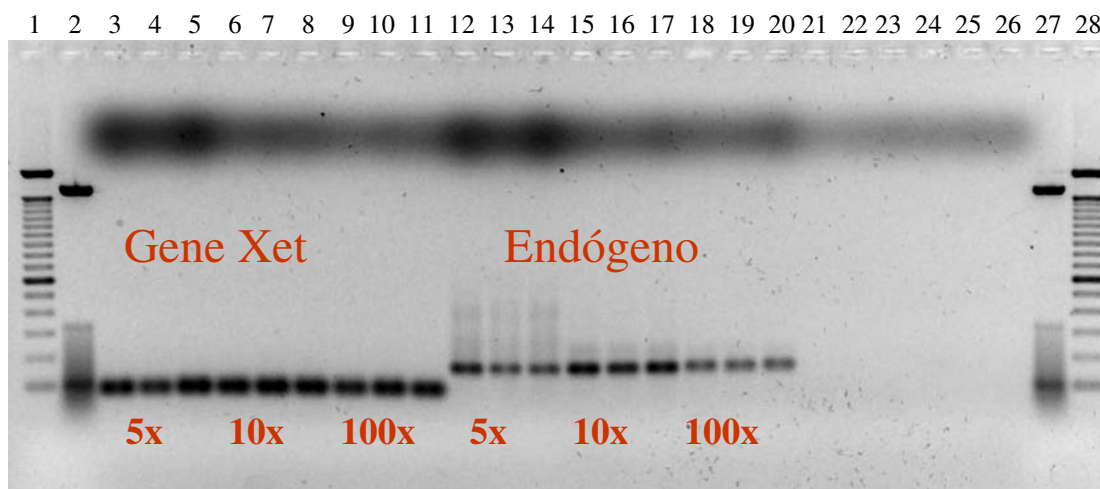


Figura 6. Corrida eletroforética em gel de agarose 1%, confirmando inexistência de produtos inespecíficos ou dímeros de *primer* para o gene que codifica para a enzima xiloglucana endotransglicosilase.

3 a 11 - amostra PI595099 inoculado “Xet”.

12 a 20 - amostra PI595099 inoculado “controle endógeno 18s RNA”.

21 a 26 - amostra “branco”.

4.4.2. Quantificação relativa

Na Figura 7 é representado exemplo de saída de dados do equipamento ABI 7300 utilizando o programa *SDS* (Applied Biosystems, *Foster City, CA, USA*), onde a magnitude do sinal de fluorescência para o gene que codifica para a enzima xiloglucana endotransglicosilase é relacionado com os ciclos na reação de amplificação por PCR.

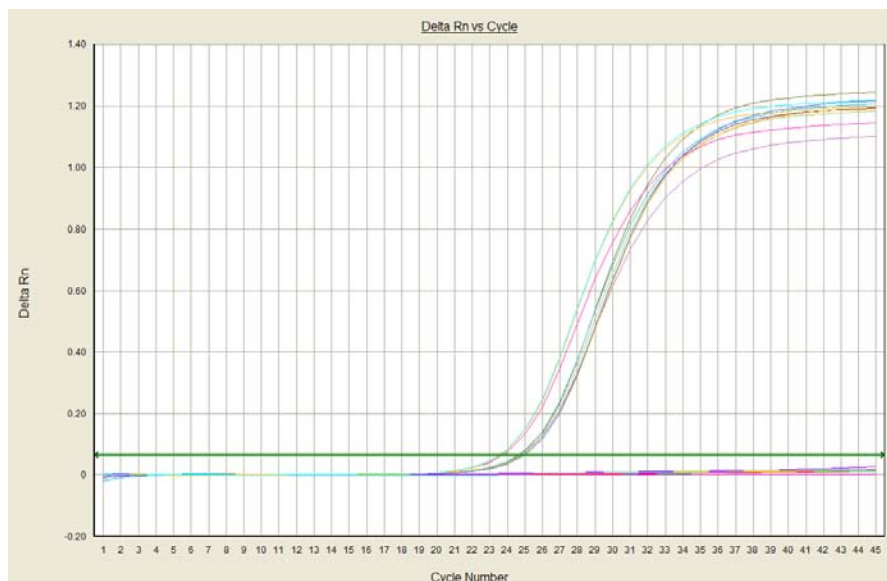


Figura 7. Gráfico gerado pelo programa *SDS* (Applied Biosystems, CA, USA) que relaciona o número de ciclos da reação de PCR de cada amostra com a magnitude do sinal de fluorescência (ΔRn) para o gene que codifica para a enzima xiloglucana endotransglicosilase.

4.4.2.1. Quantificação relativa nos parentais e nos indivíduos da população

A análise do nível de expressão dos genes estudados nos parentais e suscetíveis indicou expressão diferencial em todos os genótipos avaliados. Esses genes estão provavelmente associados a processos de resposta da planta à infecção do nematóide como, por exemplo, a síntese de fitoalexinas, o espessamento de parede celular, e os genes de patogenicidade e de resistência.

A indução do gene Chalcona sintase foi devido à presença de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* no substrato e na água usada para irrigação. Esse gene está relacionado com a nodulação da soja, e o parasitismo causado por nematóides afeta a nodulação das plantas inibindo-a. Isto é muito bem documentado, sendo que a

ausência de nódulos é uma característica do sistema radicular de plantas de soja parasitadas pelo NCS (Schmitt & Noel, 1984). ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALN (1991), demonstraram que o gene que codifica para a enzima Chalcona sintase é induzido durante a nodulação em soja.

A expressão do gene Chalcona sintase foi maior no genótipo BRS 133, sendo este resultado confirmado já que os genótipos de soja desenvolvidos no Brasil têm uma eficiência melhor do que as americanas na fixação biológica do nitrogênio. O gene que codifica a enzima Chalcona sintase (Chs) teve o nível de expressão reduzido em 50% quando comparado ao parental resistente no inoculado PI595099 (Figura 8). Nos indivíduos da população o gene teve um padrão de expressão diferente em relação aos progenitores (Figura 12). Isto pode estar relacionado com a presença aleatória da bactéria, como não houve um controle de inoculação de bactérias nas plantas.

A CHS é uma das enzimas chave na rota de biossíntese de fenilpropanóides, como as fitoalexinas, compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sintetizados e acumulados nas plantas expostas a microrganismos, a certos patógenos ou outros estresses abióticos (PAIVA & DIXON, 1995). A síntese destes compostos também é observada em resposta à penetração de nematóides (HUANG, 1985).

CAMPOS et al. (2003), mostraram o aumento da atividade da enzima Chalcona sintase em extratos de folhas de quatro cultivares de feijão inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por CUI et al. (1996), que observaram um aumento rápido na atividade de CHS em plantas de sorgo depois da inoculação com *Bipolaris maydis*.

As fitoalexinas são induzidas por uma série de estresses bióticos, sendo resposta primária a fungo. O fato da enzima chalcona sintase ter sido expressa em todas as cultivares pode estar relacionado a outro tipo de estresse que a planta poderia estar sofrendo. CAMPOS et al. (2003), detectou baixa atividade enzimática da CHS em material não inoculado, porém, constatou um aumento significativo na atividade da enzima nos materiais resistentes depois de inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*.

Uma resposta complexa que envolve a produção de fitoalexina pode ser diferente em relação a respostas a diferentes tratamentos e cultivares, com a indução da enzima CHS em diferentes níveis (TEPPER et al. 1989). A quantidade de acúmulo de mRNA da CHS afeta diretamente a biossíntese de fenóis e, possivelmente, CHS está envolvida no aumento destas combinações durante o processo de infecção (HARTLEB et al. 1997).

O gene *sth-2* teve a expressão aumentada no genótipo resistente inoculado PI595099 quando comparado ao mesmo genótipo não inoculado e no genótipo suscetível inoculado BRS133, houve redução de 52% no nível de expressão (Figura 9). Nos indivíduos da população a linhagem JF7056 foi a que teve o maior nível de expressão aumentado na condição de inoculada. (Figura 13)

A linhagem JF7056 apresentou, de acordo com SILVA et al. (2002), galhas com diâmetro mais reduzido quando comparado aos outros genótipos resistentes a *M. javanica* utilizados no trabalho, quando foi cultivada em área infestada por este nematóide. De acordo com os autores, esta característica indica maior nível de resistência ao nematóide.

É possível que somente alguns patógenos alterem o nível de expressão do gene *sth-2*. Outra hipótese é que a proteína STH-2 somente é efetiva quando combinada com outros produtos gênicos, não dando resposta a resistência somente com a sua expressão (CONSTABEL & BRISSON, 1992). Por isso a pequena expressão aumentada em 25% no genótipo resistente inoculado é característica de gene de resistência, já que o genótipo resistente, produz outros produtos gênicos que quando combinado com o STH2 resulta na característica de resistência.

A proteína STH-2 não é um componente direto da primeira linha de defesa da planta contra patógenos, mas sim a uma resposta secundária a infecção. Por exemplo, STH-2 poderia ser requerido para o conserto de estruturas, ou para o retorno do metabolismo normal da planta, uma vez que o crescimento do patógeno fosse rompido.

O gene *Sth-2* está envolvido na reação de hipersensibilidade em plantas e faz parte de uma classe distinta de proteínas relacionadas a patogenicidade (MATTON & BRISSON, 1989). A hipersensibilidade é caracterizada pela morte rápida das células

dos tecidos infectados da planta em resposta a ataques patogênicos. A necrose resultante ocorre onde o patógeno invasor se encontra e prevenindo o desenvolvimento da doença. Embora a reação de hipersensibilidade já tenha sido bastante estudada em doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, ela parece estar também relacionada intimamente com a resistência a nematóides (HUANG, 1985).

O gene que codifica para a enzima xiloglucana endotransglicosilase (Xet) teve expressão 76% superior no parental resistente PI595099 inoculado quando comparado com o mesmo genótipo não inoculado (Figura 10). Quando testada nos indivíduos da população, também teve maior nível de expressão nos indivíduos resistentes confirmando o resultado obtido nos parentais (Figura 14).

A XET está envolvida em processos de modificação da parede celular das plantas, incluindo síntese e degradação de compostos. Essa enzima também permite a expansão da célula sem danificar sua estrutura, provavelmente alterando a estrutura da parede pela adição de novos polímeros de xiloglucanas (CAMPBELL & BRAAM, 1999).

O aumento da expressão no genótipo resistente inoculado sugere que a XET esteja relacionada com o mecanismo de defesa desse genótipo à infecção de *M. javanica*, uma vez que aumentando a expressão da enzima ocorrerá conseqüentemente aumento na parede celular da planta dificultando a penetração do nematóide.

O aumento da atividade da XET foi detectado 6 horas após a infecção de plantas de tomate com *Cuscuta reflexa*. A XET foi induzida durante a fase inicial de interação planta com a planta daninha. E estresse como ferimento não influenciou a expressão da enzima. Este resultado sugere que a XET tenha um papel associado à reação de defesa com interação incompatível Cuscuta-tomate (ALBERT et al. 2004).

O gene Hs1pro-1 teve a expressão 83% superior no parental resistente PI595099 inoculado quando comparado com o mesmo genótipo não infectado pelo nematóide. Já no parental suscetível houve uma redução de 37% no nível de expressão desse gene (Figura 11). Nos indivíduos da população este gene teve o nível de expressão aumentado na linhagem resistente inoculada JF7056 (Figura 15). De acordo com SILVA et al. (2002), esta linhagem é resistente ao nematóide de cisto (*Heterodera glycines*),

nematóide da mesma família de *M. javanica*. As outras linhagens resistentes a *M. javanica*, JF7027, JF7002, são moderadamente resistente e suscetível a *H. glycines*, respectivamente, o que também explica o maior nível de expressão do gene Hs1pro-1 nas plantas da linhagem JF7056 inoculadas com *M. javanica*. A linhagem 256-S é considerada a mais suscetível a *M. javanica* das linhagens testadas neste trabalho. O gene Hs1pro-1 teve o mesmo nível de expressão tanto nas plantas inoculadas e não inoculadas. Isto corrobora a afirmação que este gene está envolvido na resistência de soja ao nematóide *M. javanica*.

O Hs1pro-1 é um gene de resistência específico ao nematóide de cisto *H. schachtii* encontrado em beterraba. Acredita-se que essa proteína pertença a uma classe de genes de resistência (R), uma vez que a provável proteína codificada apresenta regiões ricas em leucina e um domínio transmembrana típicos de proteínas de resistência (THURAU et al. 2003). Em raízes suscetíveis ao nematóide, essa proteína de resistência promove a necrose celular no local de infecção, rompendo as células de alimentação do nematóide, promovendo a degradação do sincício e a morte dos juvenis (HOLTMANN et al. 2000). No entanto, nenhuma similaridade foi encontrada em bancos de dados de genes de seqüências conhecidas, de modo que sua função específica permanece desconhecida (THURAU et al. 2003).

THURAU et al. (2003) estudaram a regulação transcricional do gene Hs1pro-1 em resposta a vários estresses. Seus resultados demonstraram que a expressão do gene Hs1pro-1 somente ocorre depois da infecção do nematóide, sendo a ativação transcricional e tecido específico, ou seja, restrito ao sítio de alimentação do nematóide. THURAU et al. (2003) também observaram que, estresses abióticos não induziram a expressão do gene Hs1pro-1.

O baixo nível de expressão do gene Hs1pro-1 nos genótipos não inoculados é explicada pela baixa atividade do Hs1pro-1 que é requerida para o reconhecimento do patógeno e para iniciar a resposta a resistência. Por outro lado, o aumento da expressão do gene na cultivar resistente inoculada demonstrou ser crucial nos sítios de alimentação para indução da resposta à resistência.

A ativação transcricional tecido específico do gene Hs1pro-1 pode aumentar a

quantidade da proteína HS1PRO-1 dentro das células de alimentação, um fator crítico para indução da resistência da planta. Esta hipótese é apoiada pela observação citológica de raízes de beterraba onde, os J2 puderam invadir as raízes e ir para o cilindro vascular para iniciar a formação do sincício. Porém o sincício não se desenvolveu devido à formação de agregações na membrana causando a degeneração do sincício e morte dos juvenis do nematóide (HOLTMANN et al. 2000).

Assim, explorar o papel da proteína Hs1pro-1 dentro da formação dessas agregações na membrana, é um passo fundamental para entender a função do gene Hs1pro-1 na resistência mediada em plantas.

O aumento da expressão do gene Hs1pro-1 em genótipo resistente após a inoculação com nematóide de galha sugere que o gene Hs1pro-1 pode estar envolvido na degeneração das células gigantes, já que a infecção com o nematóide para galha não induz a formação de sincício, sendo este exclusivo ao nematóide de cisto.

O desenvolvimento de cultivares de soja com elevada produção destes genes, que pode ser via melhoramento clássico, ou mais rapidamente via transformação de plantas, pode ser uma excelente opção para a viabilização da produção de soja em áreas infestadas. Da mesma forma, pode ser um caminho viável para o desenvolvimento de cultivares resistentes a esse nematóide em outras espécies de plantas onde a resistência ao nematóide não é comum. Como é o caso do feijão (*Phaseolus vulgaris*).

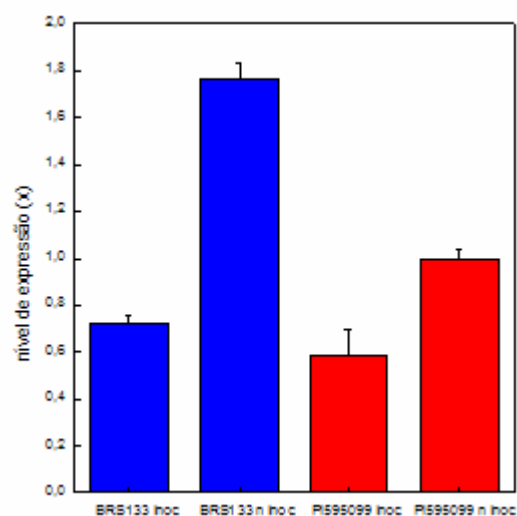


Figura 8. Nível de expressão do gene Chalcona sintase em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

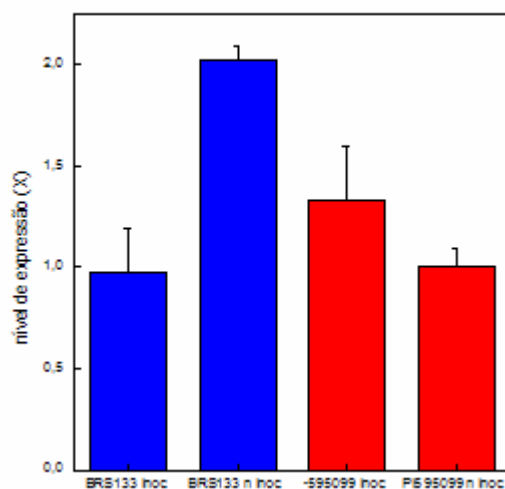


Figura 9. Nível de expressão do gene Sth-2 em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

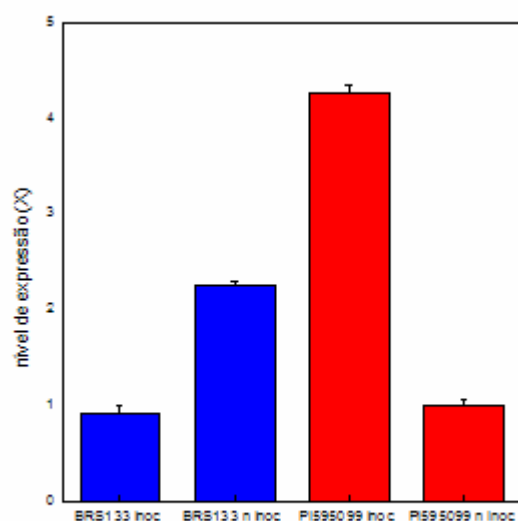


Figura 10. Nível de expressão do gene xet em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

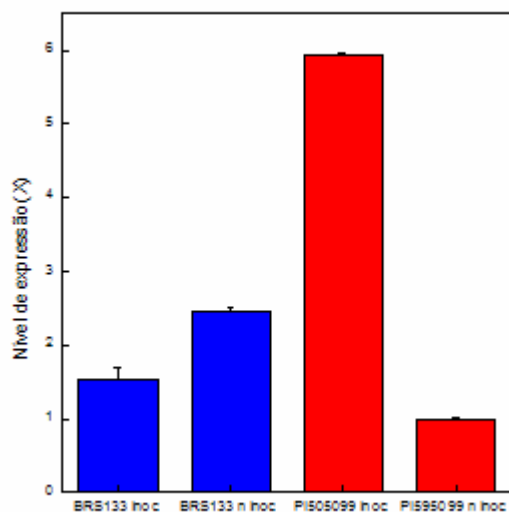


Figura 11. Nível de expressão do gene em indivíduos parentais, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

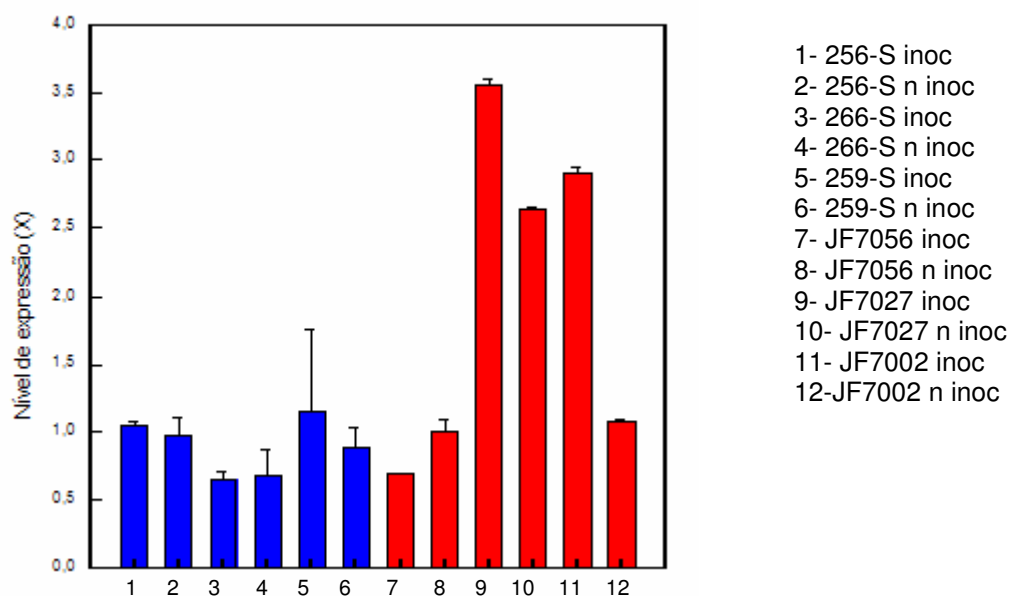


Figura 12. Nível de expressão do gene Chalcona sintase nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

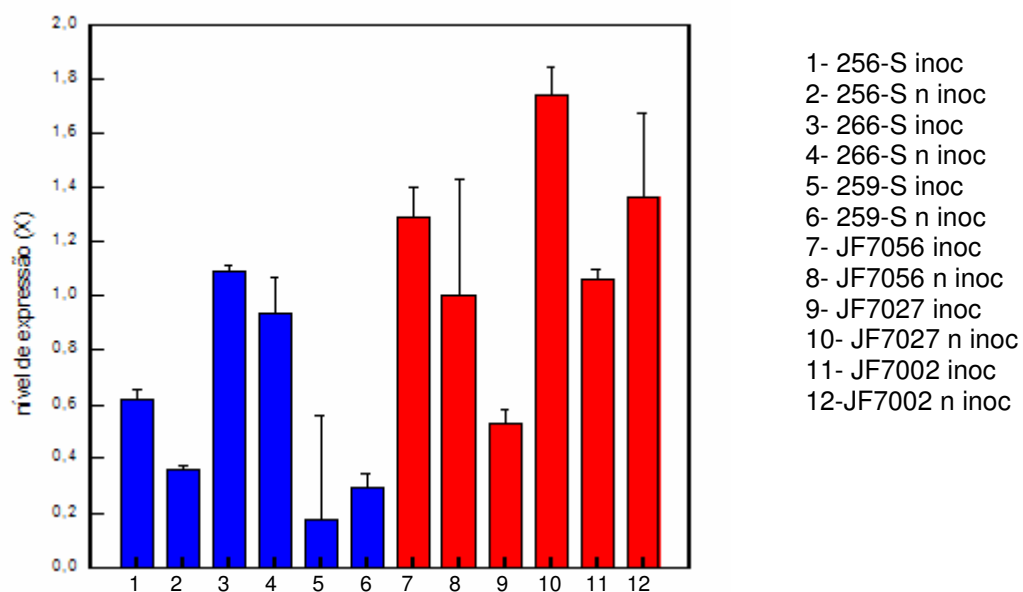


Figura 13. Nível de expressão do gene Sth-2 nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

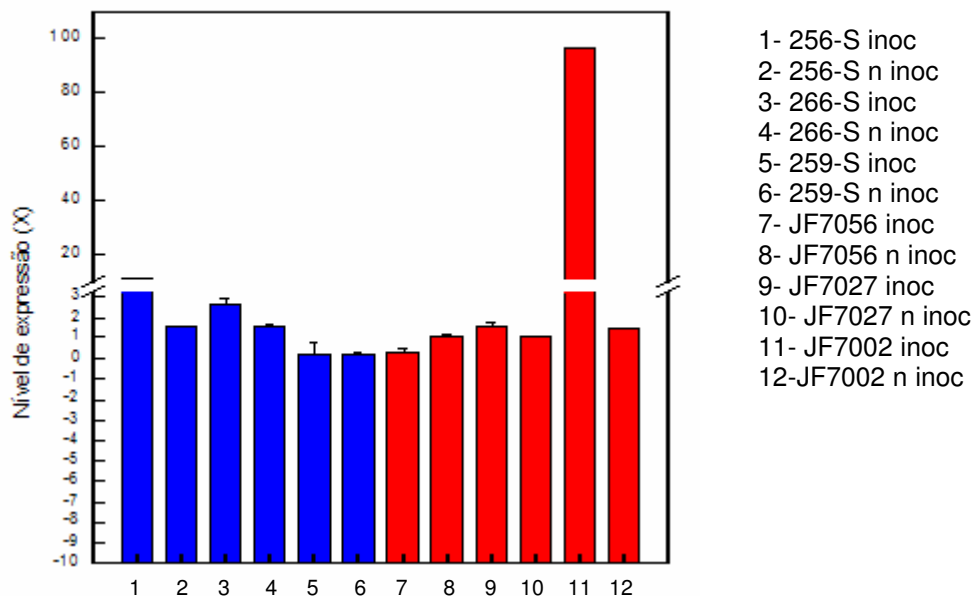


Figura 14. Nível de expressão do gene xet nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

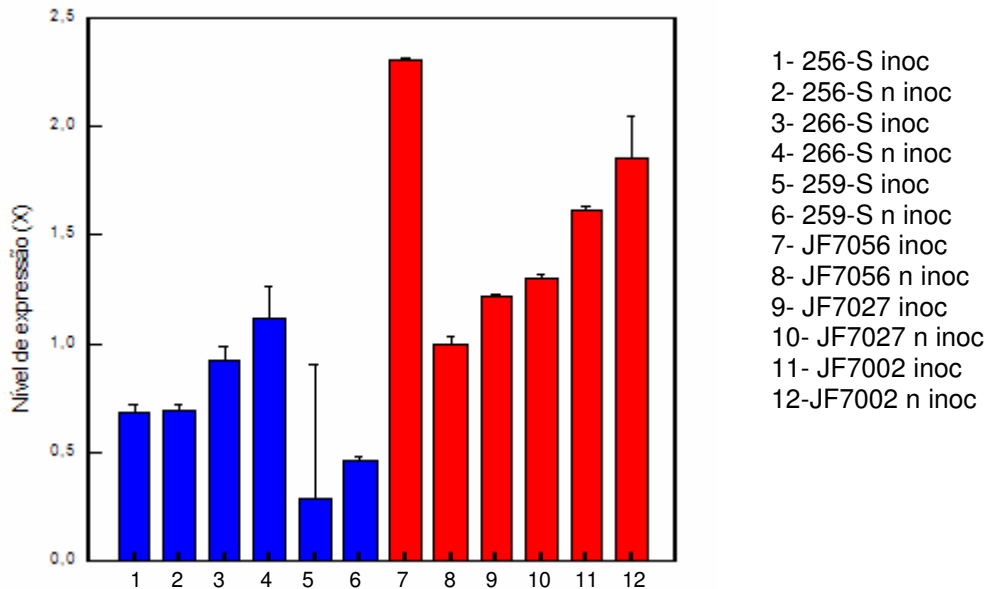


Figura 15. Nível de expressão do gene Hs1pro-1 nos indivíduos da população, suscetível e resistente inoculado e não inoculado.

5. CONCLUSÕES

Os genes testados tiveram o nível de expressão aumentado na condição de resistente inoculado, uma característica que pode contribuir para geração de plantas geneticamente modificadas.

O gene Chs quando testado nos indivíduos do parental, teve o nível de expressão reduzido nos indivíduos inoculados, comprovando que houve infecção com o nematóide, uma vez que a presença do mesmo diminui a nodulação na soja e conseqüentemente, diminui o nível de expressão da enzima chalcona sintase. Este resultado foi contrário da análise feita através da técnica de Microarranjo de DNA, confirmando que a técnica de PCR em tempo real é uma técnica mais precisa.

O gene Sth-2 teve a expressão aumentada nos indivíduos resistentes inoculados quando comparados com os indivíduos não inoculados do parental, esta expressão combinada com outros produtos de genes de resistência podem estar dando a característica de resistência à planta. A expressão nos indivíduos inoculados, confirma a análise de microarranjo de DNA, podendo este gene estar relacionado a degradação de células gigantes. Sendo um gene chave na resistência.

O gene que codifica a enzima Xet teve aumento na expressão nos indivíduos resistentes inoculados, confirmando que esta enzima esteja relacionada com o aumento de espessura da parede celular, dificultando o estabelecimento do nematóide na célula.

Análises futuras serão feitas comparando os tratamentos em separado, ou seja, a expressão dos genes será quantificada nos dias um, três e seis após a inoculação, a fim de verificar se existe diferença temporal de expressão gênica.

6. REFERÊNCIAS

ABE, I.; TAKAHASHI, Y.; MORITA, H.; NOGUCHI, H. Benzalacetone synthase: A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*, **Eur. J. Biochem.**, v.268, p.3354-3359, 2001.

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F. Complementary DNA sequencing expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v.252, p.1651-1656, 1991.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, p.6745-6750, 1977.

AMBION. **RT-PCR: The Basics.** Disponível em: <<http://www.ambion.com/techlib/basics/rtpcr/index.html>>. Acesso em: 13 set. 2006.

APPLIED BIOSYSTEMS. Relative Quantification of Gene Expression: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System , **Applied Biosystems User Bolletín #2**, 1997.

ARAVIND, L.; DIXIT, V. M.; KOONIN, E. V. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. **Trends Biochem Sci**, v.24, p. 46-53, 1999.

AUTIN, M. B. & NOEL, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases, **Nat Prod Rep**, v.20, p.79-110, 2003.

BALARDIN. **Fundamentos da resistência em plantas.** Disponível em: <<http://www.balardin.com.br/publi.php?cat=4> >. Acesso em: 28 ago. 2006.

BASSET, D. E.; EISEN, M. B.; BOGUSKI, M.S. Gene expression informatics - it's all in your mine. **Nature Genetics Supplement**, v.21, p.51-55, 1999.

BERK, A.J. & SHARP, P.A. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. **Cell**, v.12, p.721–732, 1977.

BIRREN, B. Genome analysis: a laboratory manual. **Detecting Genes**, v.2, p.49-58, 1997.

BOERMA, H. R. & HUSSEY, R. S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, v.24, p.242-252, 1992.

BUSTIN. S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinoly**, v.25, p.169-193, 2000.

BYRD, J. R. D. W.; KIRKPATRICK, J. E.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v.15, p.142-143, 1983.

CAMPBELL, P. & BRAAM, J. in vitro activities of four xyloglucan endotransglycosylase from *Arabidopsis*, **Plant Journal**, v.15, p.553-561, 1999.

CAMPOS A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCAO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and colletotrichum lindemuthianun in common bean. **Braz. J. Plant. Physiol**, v.15, p.129-134, 2003.

CAMPOS, V. P. **Manejo de doenças causadas por fitonematóides**. Lavras: UFLA – FAEPE, 1999. 106p.

CAMPOS, V. P. Doenças causadas por nematóides no cafeeiro. In: DO VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas**. v.1. Viçosa: UFV, 1997. p.145-167.

CAMPOS, V. P.; SILVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. Nematodes of Coffee, Cocoa and Tea, In: M. LUC; R. SIKORA; J. BRIDGE. **Plant Parasitic Nematodes in Sub Tropical and Tropical Agriculture**. Paris C.A.B: International Institute of Parasitology, 1990. p. 461-491.

CARPITA, N. & MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. 2000. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland, EUA: American Society for Plant Physiologists, 2000. p.52-108.

CHIANG, C. C. & HADWIGER, L. A. Cloning and characterization of a disease resistance response gene in pea inducible by *fusarium solani*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, p.78-85, 1990.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v.162, p.156-159, 1987.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 07 jan. 2007.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 19 jun. 2005.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares, **Ciência Rural**, v.36, p.315-324, 2006.

CONSTABEL C. P. & BRISSON N. The defense- related STH-2 gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. **Plant**, v.188, p.289-295, 1992.

CONSTABEL, C. P.; BERTRAND, C.; BRISSON, N. Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis- related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.775-782, 1993.

COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Ivo Manica e José Antônio Costa (Ed.), 1996. 233p.

COSTAMILAN, L. M. Estresses ocasionados por doenças e por nematóides. In: BONATO, E. R. **Estresses em Soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000, p.254.

CUI, Y.; MAGILI, J.; FREDERIKSEN, R.; MAGILI, C. Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.49, p.187-199, 1996.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infections. **Nature**, v.411, p.826-833, 2001.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J.; BAKKER, J.; SCHOTS, A.; ROSSO, M. N.; ABAD, P. Nematode parasitism genes. **Annu. Rev. Phytopath.**, v.38, p.365-396, 2000.

DEYHOLOS, M. K., GALBRAITH, D. W. High-density *microarrayss* for gene expression analysis. **Cytometry**, v.43, p.229-238, 2001.

DIXON, R. A. & PAIVA, N. L. Stress induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.

ELLIS, L.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.3, p.278-284, 2000.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Sistemas de Produção: **Tecnologias de Produção de Soja no Paraná 2005**, Londrina: Embrapa Soja, 2005a. 227p.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Sistemas de Produção: **Tecnologias de Produção de Soja na Região Central do Brasil 2005**, Londrina, Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste: Fundação Meridional, 2005b. 239p.

ESTABROOK E. M. & SENGUPTA-GOPALAN, C. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. **Plant Cell**, v.3, p.299-308, 1991.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L. & FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 2001. 127p.

FERRAZ, L. C. C. B. & MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMAI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.168-201.

FEYS, B. J. & PARKER, J. E. Interplay of signaling pathway in plant disease resistance. **Trends Genet.**, v.16, p.449-455, 2000.

FRY, S. C. The structure and functions of xyloglucan. **J. Exp. Bot.**, v.40, p.1-11, 1989.

GIULIETTI, A; OVERBERGH, L.; VACKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An Overview of real-time Quantitative PCR: Applications to quantify Cytokine Gene Expression. **Methos.** v.25, p.386-401, 2001.

GOELDI, E. A: Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na província do Rio de Janeiro. **Arq. Museu nacional**, p.7-123, 1887.

GOLDSWORTHY, S. M.; GOLDSWORTHY T. L.; SPRANKLE C. S.; BUTTERWORTH B. E. Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of proliferation. **Cell proliferation**, v.26, p.511-518, 1993.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptor in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.

HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi.** Stuttgart: G. Fischer, 1997. 544p.

HAYASHI, T. Xyloglucan in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.40, p.139-168, 1989.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v.6, p.986-94, 1996.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio-Technology**, v.10, p.413-417, 1992.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFLAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3'exonuclease activity of thermos aquaticus DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.88, p.7276-7280, 1991.

HOLTMANN, B.; KLEINE, M.; GRUNDER F. M. W. Ultrastructure and anatomy of nematode induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. **Protop.**, v.211, p.39-50, 2000.

HUANG, J. S. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER, J. N. & CARTER, C. C. **An advanced treatise on *Meloidogyne*: Biology and control**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. v. 1, p.11-17.

HUSSEY, R. & BARKER, K. R. A Comparations of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

KAPLAN, D. T. & DAVIS, E. L. Mechanisms of plant incompatibility with nematodes. In: VEECH, J. A. & DICKSON, D. W. **Vistas on Nematology**, Hyasttsville: Society of Nematologists, 1987. p.267-276.

KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T.; THOMASON, I. J. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Physiology Plant Pathology**, v.16, p.319-325, 1980a.

KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T.; THOMASON, I. J. Association of gliceollin with the incompatible response of roots to *Meloidogyne incognita*. **Physiology Plant Pathology**, v.16, p.309-318, 1980b.

LIANG, P.; PARDEE A. B. Recent advances in *Differential Display*. **Current Opinion in Immunology**, v.7, p.274-280, 1995.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LEE, H.; LEON, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the national Academy of Science**, v.92, p.4072-4079, 1995.

LEROI, A. M. & JONES, J. T. Developmental biology. In: PERRY, R. N. & WRIGHT, D. J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant- parasitic nematodes**. Wallingford: CAB Internacional, 1998. p.55-180.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, 1988.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v.147, p.24-31, 1999.

MARINEAU, C.; MATTON, D. P.; BRISSON, N. Differential accumulation of potato tuber mRNAs during the hypersensitive response induced by arachidonic acid. **Plant Mol. Biol.**, v.9, p.335-342, 1987.

MATTON, D. P. & BRISSON, N. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis- related gene transcripts of potato. **Molecular plant-microbe**

interactions. v.2, p.325-331, 1989.

MCCAM, M.C. & ROBERTS, K. Changes in cell wall architecture during cell elongation. **Journal Exp. Bot.**, v.45, p.1683-1691, 1994.

NOVAIS, C. M. & PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real, **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

PANDA, S.; SATO, T. K.; HAMPTON, G. M.; HOGENESCH, J. B. An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. **Trends Cell Biol.**, v.13, p.151-156, 2003.

PRITCHARD, J. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientations and profiles of cell wall- properties along growing regions of maize roots. **Journal Exp. Bot.**, v.44, p.1281-1289, 1993.

REDGWELL, R. J.; FRY, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening. **Plant Physiol.**, v.103, p.1299-1406, 1993.

ROBERTS, P. A.; MATTHEWS, W. C. & VEREMIS, J. C. Genetic mechanisms of host-plant resistance to nematodes. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A. & WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. Madison, USA: American Society of Agronomy, 1998. p.209-238.

ROBERTS, P. A. Resistance to nematodes: definitions, concepts and consequences. In: STARR, J. L. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant- parasitic nematodes**. Maryland: Society of Nematologists, 1990. p.01-15.

ROSE, J. K. C.; BRUMMELL, D. A.; BENNETT, A. B. Two divergent xyloglucan endotransglycosylase exhibit mutually exclusive patterns of expression in nasturtium. **Plant Physiol.**, v.110, p.493-499, 1996.

SCHENA, M. & DAVIS, R. W. Genes, genomes and Chips. In: SCHENA, M. **DNA Microarrays: A Practical Approach**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1999. p.01-16.

SCHENA, M. Genome analysis with gene expression *microarrays*. **BioEssays**, v.18, p.427-431, 1996.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of genes expression pattern with a complementary DNA *microarrays*. **Science**, v.270, p.467-50, 1995.

SCHIMITT, D. P. & NOEL, G. R. Nematode parasites of soybeans. In: NICKLE, W. R. **Plant and insect nematodes**. New York: Marcel Dekker, 1984. p.13-59.

SIKORA, R. A. & GREGO, N. Nematode parasites of food legumes. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. London: CAB International, 1990. p.181-235.

SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S.; YORINORI, J. T.; ALMEIDA, A. M. R.; ARIAS, C. A. A.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A.; OLIVEIRA, E.; LIMA, C. G.; SCHÖBER, I. C.; FILHO, G. G.; AGLIGLIERI, G. M. G.; GOMES, J. I.; SOUZA, N. V.; BENATO, L. C. **Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a patógenos**. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Soja), Londrina: Embrapa Soja, n.1, 2002. 43p.

SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. **B. Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 2001. 127p.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New Phytologist**, v.132, p.1-45, 1996.

SOBCZAK, M.; GOLINOWSKI, W. and GRUNDLER, F. M. W. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* roots induced during development of males of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. **Eur. J. Plant Path.**, v.103, p.113-114, 1997.

SOMSSICH, I. E.; SCHMELZER, E.; KAWALLECK, P.; HAHLBROCK, K.. Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. **Mol. Gen. Genet.**, v.213, p.93-98, 1998.

STARR, J. L. **Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes**. Hayattsville, MD: Society of Nematologists, 1990. 87p.

STEINMETZ, L. M.; DAVI, R. W. Maximizing the potential of functional genomics. **Nature Genetics Rewies**. v.5, p.156-201, 2004.

TANG, X.; FREDERICK, R.; HALTERMAN, D.; ZHOU, J.; MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPTo with Pto kinase. **Science**, v.274, p.2060-2063, 1996.

TEPPER, C.; ALBERT, F.G.; ANDERSON, A.J. Differential mRNA accumulation in three cultivars of bean in response to elicitors from *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 34, p.85-98, 1989.

THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C. & CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene HS1^{pro1} activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**. v.52, p.643-660, 2003.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.

TRAUT, T. W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. **Eur. J. Biochem.**, v.222, p.9-19, 1994.

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

VAN DER PLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VANETTEN, H. D.; SANDROCK, R.; WASMAN, C. C.; SOBY, S. D.; MCCLUSKEY, K.; WANG, O. Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. **Canadian Journal of Botany** v.73, p.518-525, 1995.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, p.484-487, 1995.

VIERHUIS, E.; YORK, W.S.; KOLLI, V.S.K.; VINCKEN, J.P.; SCHOLS, H.A.; VAN ALEBEEK, G.; VORAGEN, A. G.J. Structural analyses of two arabinose containing

oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. **Carbohydr. Res.**, v.332, p.285-291, 2001.

VISSENBERG, K.; FRY, S. C.; VERBELEN, J. P. Root hair initiation is coupled to a highly localized increases of xyloglucan endotransglycosylase action in Arabidopsis roots. **Plant Physiol.**, v.127, p.1125-1135, 2001.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Anal Biochem.**, v.276, p.59-64, 1999.

VO-DINH, T. DNA chips: technology and applications. **Clinical Laboratory**, v.25, p.12-16, 2001.

WALTER, M. H.; LIU, J. W.; GRAND, C.; LAMB, C. J.; HESS, D. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. **Mol. Gen. Genet.**, v.222, p.353-360, 1990.

WANG T. & BROWN M. J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.198-201, 1999.

WENDLAND, A.; NEPOMUCENO, A. L.; SILVA, J. F. V.; MENTEN, J. O. M.; BINNECK, E.; MARIN, S. R., R.; SILVBEIRA, C. A., MORALES, A. M. R.; TRAVENSOLO, R. F.; ALVES, L. C.; LOPES, T. & LEMOS, E. G. M. Genetic expression of soybean-*Meloidogyne javanica* - interaction revealed by analyses of microarrays. In: VII CONFERÊNCIA MUNDIAL DE PESQUISA DE SOJA - IV CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PROCESSAMENTO E UTILIZAÇÃO DE SOJA - III

CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2004. **Anais...** Foz do Iguaçu: Embrapa, 2004. p.320.

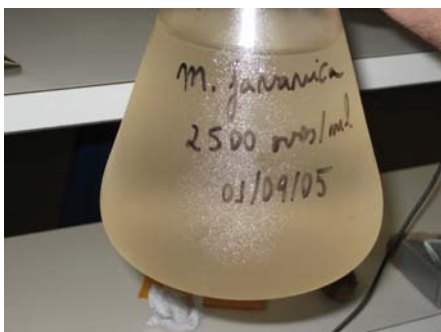
WHITE, A. R.; XIN, Y.; PEZESHK, V. Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea). **Biochem J.**, v.294, p.231-238, 1993.

WIKIPEDIA. **Fabaceae**. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>>. Acesso em: 14 fev. 2007.

YUEN, T.; WURMBACH, E.; PFEFFER, R.L.; EBERSOLE, B.J.; SEALFON, S.C. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. **Nucleic Acids Res.**, v.30, 48p, 2002.
v.30, 48p, 2002.

ANEXOS

Montagem da câmara de eclosão



Transferência das plântulas para casa de vegetação



Não inoculada



**Suspensão
680 J2 por planta**

Coleta: 1 dia, 3 dias , 6 dias

Preparação de Material de Laboratório Livre de Ribonucleases

- Luvas devem ser utilizadas em todos os trabalhos envolvendo RNA. Estas devem ser trocadas toda vez que tocarem em materiais ou equipamentos que outras pessoas tocaram sem luvas.
 - Todos os materiais utilizados na extração, como cadinhos, pistilos, espátulas e tubos, devem ser incubados, em capela, por 12 horas com água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), secos e embalados com papel alumínio, autoclavados por 20 min a 120°C e secos em estufa.
 - As cubas de eletroforese e pentes para RNA devem ser lavadas com 0,01% de SDS e enxaguadas com água livre de RNase.
 - Todas as soluções usadas para trabalhos com RNA devem ser preparadas com água 0,01% DEPC autoclavada. Como o DEPC reage com aminas, não pode ser usado para tratar soluções contendo tampão Tris, nem no tratamento de solventes orgânicos.
 - Água livre de ribonuclease deve ser preparada adicionando-se dietilpirocarbonato (DEPC) a uma concentração final de 0,1% (V/V) à água bidestilada (ou equivalente). Depois de autoclavar durante uma hora, abrir a autoclave rapidamente para deixar o vapor sair. A água DEPC tratada é então deixada *overnight* em agitação leve com aquecimento para decompor o DEPC residual. Uma outra opção é ferver a água por pelo menos 30 min em uma tela de amianto. O DEPC deve ser totalmente eliminado, a presença de traços pode ser verificada após a água esfriar, pelo odor doce, açucarado, característico da DEPC. Se algum DEPC permanecer a água DEPC deve ser autoclavada novamente ou fervida por 15 min ou mais. Todo DEPC deve ser eliminado da água, pois o DEPC pode alterar a atividade enzimática.
- Obs.: O DEPC deve ser manuseado com cuidado, usando luvas e máscara e manipulado em capela sempre que possível, pois é inflamável e mutagênico.
- As soluções livres de ribonuclease são preparadas por tratamento com DEPC como descrito acima. Todas as soluções são autoclavadas por pelo menos trinta minutos.

Autoclavando efetivamente inativa-se muitas classes de ribonucleases, as quais podem contaminar reagentes em quantidades evidentes.

- Soluções contendo o tampão Tris não podem ser tratadas com DEPC, pois o Tris inativa o DEPC. Em adição, o acetato de amônio é relativamente volátil, com isso este também não deve ser autoclavado. Reagentes dessa natureza devem ser preparados utilizando água livre de ribonuclease. (água tratada com DEPC).
- Utensílios de plástico e equipamentos que não podem ser autoclavados, são lavados, enxugados e tratados com *Rnase AWAY* (Invitrogen- Life Technologies) para remover as Rnases das superfícies.

Reação da transcrição Reversa Utilizando-se Transcriptase Reversa (*M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen*)

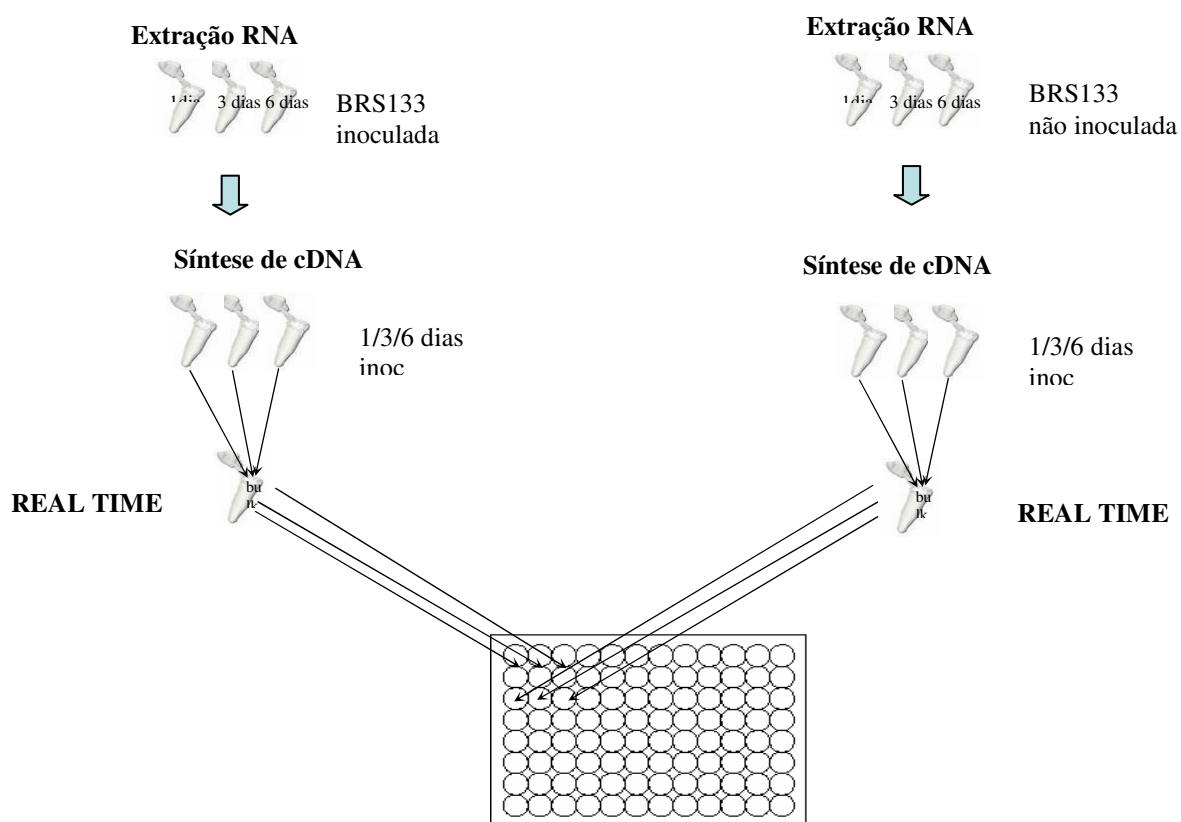
Reagentes	Quantidade
RNA	10 µL
<i>Primer oligo dT</i> (10µM)	2 µL
Tampão 5x <i>first strand</i>	6 µL
dNTP`s (2,5mM)	4 µL
DTT (0,1M)	2 µL
Enzima RT	2 µL
H ₂ O DEPC	4 µL

Adicionar:

- 10 µL de RNA
- 2 µL *Primer oligo dT* (10µM);
- Deixar a 80°C por 3 min, E em seguida resfriar no gelo
- Adicionar os seguintes reagentes:
- Tampão 5x *first strand* = 6 µL
- dNTP`s (2,5mM) = 4 µL
- DTT (0,1M) = 2 µL
- Enzima RT = 2 µL
- H₂O DEPC = 4 µL
- Volume final da reação: 30µL

PCR em tempo real

→ Esquema do preparo das amostras



Condições para amplificação por PCR em Tempo Real utilizando o kit Platinum Sybr Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)

Reagentes	Quantidade para uma reação
Platinum [®] SyBR [®] Green qPCR	12,5 µL
Rox	3 µL
Agua	7,5 µL
cDNA	2 µL
Primer F (3 µM)	3 µL
Primer R (3 µM)	3 µL

→ Condições de ciclagem serão as seguintes:

50 °C – 2 min	}	45 ciclos
95 °C – 2 min		
95 °C – 15 seg		
63 °C – 30 seg		
72 °C – 30 seg		

Análise dos dados

A análise dos dados será feita pelo programa acoplado ao aparelho (*sequence detection*) onde serão plotados os gráficos

Curva de eficiência

→ Material: PI595099 inoculado

→ Diluição: 5x

10x

100x

→ Primer: 3 pmol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x			
B	10x	10x	10x	10x	10x	10x	10x	10x	10x			
C	100x	100x	100x	100x	100x	100x	100x	100x	100x			
D	bco	bco	bco	bco	bco	bco	bco	bco	bco			
E	5x	5x	5x	5x	5x	5x						
F	10x	10x	10x	10x	10x	10x						
G	100x	100x	100x	100x	100x	100x						
H	bco	bco	bco	bco	bco	bco						

STH-2

Chs

Hs1pro-1

Xet

RNAr18S

Quantificação Relativa nos indivíduos parentais

- Bulk1 = resistente inoculado (1 dia, 3 dias, 6 dias) PI595099
- Bulk2 = resistente não inoculado (1 dia, 3 dias, 6 dias) PI595099
- Bulk3 = suscetível inoculado (1 dia, 3 dias, 6 dias) BRS133
- Bulk4 = suscetível não inoculado (1 dia, 3 dias, 6 dias) BRS133

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	BCO	BCO	BCO
B	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2			
C	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3			
D	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4			
E	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	Bulk 1	BCO	BCO	BCO			
F	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	Bulk 2	BCO	BCO	BCO			
G	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	Bulk 3	BCO	BCO	BCO			
H	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	Bulk 4	BCO	BCO	BCO			

Sth-2

Chs

Hs1pro-1

Xet

RNAr18S

Quantificação relativa nos indivíduos da população

- Bulk1 = 256-S inoculado
- Bulk2 = 256-S não inoculado
- Bulk3 = 259-S inoculado
- Bulk4 = 259-S não inoculado
- Bulk5 = 266-S inoculado
- Bulk6 = 266-S não inoculado
- Bulk7 = JF7002 inoculado
- Bulk8 = JF7002 não inoculado
- Bulk9 = JF7027 inoculado
- Bulk10 = JF7027 não inoculado
- Bulk11 = JF7056 inoculado
- Bulk12 = JF7056 não inoculado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	bulk1	bulk1	bulk1	bulk7	bulk7	bulk7	bulk1	bulk1	bulk1	bulk7	bulk7	bulk7
B	bulk2	bulk2	bulk2	bulk8	bulk8	bulk8	bulk2	bulk2	bulk2	bulk8	bulk8	bulk8
C	bulk3	bulk3	bulk3	bulk9	bulk9	bulk9	bulk3	bulk3	bulk3	bulk9	bulk9	bulk9
D	bulk4	bulk4	bulk4	bulk10	bulk10	bulk10	bulk4	bulk4	bulk4	bulk10	bulk10	bulk10
E	bulk5	bulk5	bulk5	bulk11	bulk11	bulk11	bulk5	bulk5	bulk5	bulk11	bulk11	bulk11
F	bulk6	bulk6	bulk6	bulk12	bulk12	bulk12	bulk6	bulk6	bulk6	bulk12	bulk12	bulk12
G												
H	bco	bco	bco				bco	bco	bco			

 Gene

 RNAr 18S

Eletroforese em gel de agarose 1%

- Pesar 2,5g agarose e adicionar 250mL TBE 1X. Dissolver no microondas e resfriar.
- Adicionar 2,5µL de brometo de etídio e homogenizar.
- Correr a 90 volts por aproximadamente 1h.

Preparo de reagentes

▪ TBE (10X)

- 216g tris base
- 110g ácido bórico
- 80mL EDTA (0,5M pH 8,0)
- Colocar 1600mL de água destilada em um béquer de 2L, adicionar o tris base e o ácido bórico. Colocar sob agitação para dissolver completamente. Adicionar os 80mL de EDTA e completar com água destilada em proveta para o volume final de 2L.

▪ TBE (1X)

- 100mL de TBE (10x)
- 900mL de H₂O destilada

- **Tampão de Amostra - 40% sacarose**

- 4g sacarose
- 0,025g de azul de bromofenol
- Solubilizar a sacarose em 10mL de água destilada, acrescentar o azul de bromofenol e agitar. Manter em geladeira.

- **Brometo de Etídio**

- 10mg/mL (Estoque)
- 0,1g de Brometo de Etídio
- 10mL de água destilada
- Armazenar em local escuro. Manipular com luvas.