



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**MARIANA REIS ARANTES**

**EXPRESSÃO GÊNICA DA TOXINA DA SOJA (SBTX) DURANTE O**  
**DESENVOLVIMENTO DA SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] E SEU ENVOLVIMENTO**  
**NA DEFESA VEGETAL**

**FORTALEZA**

**2015**

MARIANA REIS ARANTES

EXPRESSÃO GÊNICA DA TOXINA DA SOJA (SBTX) DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DA SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] E SEU ENVOLVIMENTO NA  
DEFESA VEGETAL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica  
Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Co-orientadora: Profa. Daniele Oliveira Bezerra de  
Sousa

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- A684e      Arantes, Mariana Reis.  
              Expressão gênica da toxina da soja (SBTX) durante o desenvolvimento da soja [*Glycine max* (L.)  
              Merril] e seu envolvimento na defesa vegetal / Mariana Reis Arantes. – 2015.  
              120 f. : il. color.
- Dissertação(mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de  
              Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza,  
              2015.  
              Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.  
              Coorientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.  
              Área de Concentração: Ciências Biológicas II.
1. Soja. 2. Regulação da expressão gênica. I. Título.

---

CDD 574.192

MARIANA REIS ARANTES

EXPRESSÃO GÊNICA DA TOXINA DA SOJA (SBTX) DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DA SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] E SEU ENVOLVIMENTO NA  
DEFESA VEGETAL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica  
Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

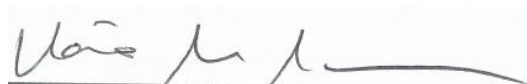
Co-orientadora: Profa. Daniele Oliveira Bezerra de  
Sousa

Aprovada em: 05 de Março de 2015

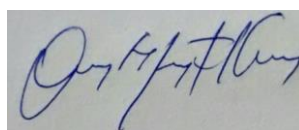
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Darcy Mayra Furtado Gondim  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meus pais, meu irmão e ao Igor.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Ilka Maria Vasconcelos, por todo suporte que tem me dado ao longo desses seis anos de LabTox, por toda ajuda que me deu na elaboração deste trabalho. Agradeço por todo seu esforço e tempo dedicados para que não apenas obtivéssemos um bom trabalho, mas pela preocupação e carinho que tem com todos seus alunos. Também sou grata por, em meio a aplausos e puxões de orelha, ter me orientado a ser uma pesquisadora e pessoa melhor.

ÀS doutoras Darcy Mayra Furtado Gondim e Vânia Maria Maciel Melo por prontamente terem aceitado o convite de fazer parte da minha banca e por suas valiosas sugestões.

À Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa por sempre estar disposta a ajudar, por suas sugestões feitas ao longo deste trabalho e por ser uma amiga que sempre nos dá forças e ânimo quando tudo parece dar errado.

À Dra. Janne Keila Sousa Moraes, vulga Jannezinha, que tanto me ajudou nesse fim de mestrado. Muito obrigada por passar horas comigo no whatsapp fazendo as correções, por me dar forças mesmo quando o sono e o cansaço me impediam de avançar. Obrigada por sua orientação em minha iniciação científica, muito do que sei hoje devo a tudo que me ensinou, nas altas horas da noite enquanto esperávamos a CM acabar, ou fazendo leitura dos ensaios com levedura. Obrigada por tudo mesmo!

Aos amigos do LabTox: Bella, por suas inúmeras tentativas de me fazer malhar, Marina, por ser minha companheira nas gordices, Nadine Linda, por sempre estar alegre e nos fazer rir do seu jeito “lindo” de ser, Ana Paula, por ser uma biblioteca ambulante de livros legais e se unir a mim para encher o saco do Lucas, Paulo, por suas piadas nerds que descontraem o ambiente, Tarcy, por ser uma pessoa única e nos mostrar que coisas impossíveis sempre podem acontecer, Xavier, por me mostrar que as coisas sempre podem piorar e pelos inúmeros doces que me deu juntamente com os quilos a mais, Mirella por sua contribuição em todos os trabalhos do lab, por sua amizade e por saber fazer um patê de frango como ninguém e Tiago, por... Não tenho nada a agradecer a ele. Em especial agradeço aos amigos Helen (que está toda poderosa na Alemanha agora), por ser sempre prestativa e ter iniciativa nos pepinos do dia-a-dia, além de ser uma grande amiga, e Lucas, que atura as minhas brincadeiras mesmo quando sei que sua vontade é de me matar, pelas conversas

científicas que tanto edificam meu conhecimento e por suas palhaçadas que divertem todo o laboratório. Agradeço a todos vocês por tornarem nosso laboratório um segundo lar para mim.

À professora Arlete Aparecida Soares por sua inestimável colaboração, não apenas por sua ajuda na parte técnica da imunohistoquímica, mas por suas palavras de consolo nas inúmeras tentativas que deram erradas.

Ao professor José Hélio Costa por sua colaboração e disposição em tirar dúvidas ao longo de toda minha dissertação. À Kátia por sua disponibilidade em me ajudar na bancada e na análise dos dados de expressão gênica, por prontamente responder a meus inúmeros e-mails.

Ao professor José Tadeu Abreu de Oliveira, por seus ensinamentos e sugestões que muito enriquecem o trabalho de todos no laboratório. Também agradeço a seus estudantes pelo auxílio na utilização de reagentes e equipamentos bem como suas contribuições com ideias e sugestões.

Aos amigos de infância, quase irmãos, Lara, Marina e Thiago que, mesmo tirando onda com minha cara por 15 anos sempre estão ao meu lado torcendo por mim, por nunca deixar a distância ou os estudos/trabalho interferirem em nossa amizade. À Thaís também agradeço por sua grande paciência comigo e minhas ausências, por me ensinar tanto com seu exemplo de vida.

Ao Hélio Job por jamais ter mudado nada em relação a nossa amizade mesmo depois de seis anos, por sempre estar disposto a me ajudar e me escutar, mesmo que seja por horas, ninguém mandou você virar psicólogo, agora tem que me aguentar!! À Elisa, que mesmo com uma agenda hiper ocupada, ainda responde as minhas mensagens mesmo que dias depois, ao Handerson por ser uma enciclopédia ambulante de curiosidades e coisas exóticas.

À Cecília por sempre tentar animar a todos a sua volta, por sua paciência comigo nas aulas de teclado e por sua tentativa frustrada de ser magra comendo burger king. À Débora que, com seu jeito “doce” e “meigo” sempre tentar nos ensinar a nos valorizar mais e não deixar que outros nos coloquem para baixo. Ao Gabriel e Vera que nesse pouco tempo têm me dado muito apoio e por todo o companheirismo de vocês. À Sarah por ser tão fina e chique e tentar me fazer ser menos mão de vaca, por estar sempre animada para nossas programações mesmo que seja andar até esquina. Obrigada a todos vocês por me aturarem nesses dias falando sem parar nessa dissertação e mesmo assim por não ter perdido a paciência.

Ao meu xuxuzinho, Igor, por me aguentar nesses seis anos, principalmente nos momentos mais difíceis. Agradeço por todo seu amor e carinho dedicados a mim, sempre dando apoio em minha vida acadêmica e pelos puxões de orelha de vez em quando

necessários. Obrigada por ser essa pessoa tão fácil de conviver, brincalhona, que me coloca para cima quando estou desanimada. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, Cristina e Eduardo, por tanto terem se esforçado em suas vidas para eu poder chegar onde estou. Agradeço pelo exemplo que vocês representam para mim e pela educação que me deram. Também agradeço ao meu irmão Pedro, por, apesar de ser 11 anos mais novo, já é um companheiro para mim, me ajudando quando peço e por ter paciência comigo quando banco a irmã chata.

Por fim, agradeço a Deus por ter me sustentado em cada etapa de minha vida, me dando forças para superar cada desafio enfrentado, por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho.



## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

**Universidade Federal do Ceará** - Laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** - Através da concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora do trabalho e, também, auxílio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

**Demais Instituições de Fomento e Apoio à Pesquisa - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)**, pela concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, destacando-se por sua multiplicidade de uso. Entretanto, perdas na produtividade de seus grãos em campo são ainda consideráveis, particularmente oriundas das doenças causadas por fungos. Diante desse obstáculo, emerge a necessidade de busca de moléculas naturais capazes de inibir o progresso dessas doenças, sem causar impactos ambientais. Dentre as moléculas presentes na soja, com potencial de uso para essa finalidade, destaca-se a toxina da soja (SBTX), uma proteína isolada de sementes, composta por duas subunidades (17 e 27 kDa) e ativa contra fungos fitopatogênicos. Esse trabalho teve como objetivos verificar a localização tecidual da SBTX em cotilédones de sementes maduras, bem como avaliar seu perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da soja e, também, em resposta ao tratamento com elicitores de defesa vegetal. Sementes de soja foram cultivadas em casa de vegetação e, ao longo do desenvolvimento da planta, diferentes tecidos vegetais coletados. Em adição, folhas primárias da soja foram tratadas com ácido salicílico (AS) ou inoculadas com esporos do fungo *Cercospora kikuchii* (CK) e coletadas em diferentes tempos após os tratamentos. Iniciadores foram desenhados com base nas sequências NH<sub>2</sub>-terminal das subunidades de SBTX e a expressão gênica foi avaliada pela técnica de RT-PCR quantitativa. A localização de SBTX em sementes foi avaliada por imunohistoquímica, usando anti-SBTX. Transcritos dos genes *SBTX17* e *SBTX27* foram detectados em todos os tecidos vegetais coletados, porém seus níveis de expressão foram diferenciados. Níveis mais elevados de transcritos para ambas as subunidades da SBTX foram detectados em sementes maduras, cotilédones e folhas unifoliadas. Nos cotilédones, SBTX foi encontrada na epiderme. Indução da expressão de transcritos da SBTX ocorreu em ambos os tratamentos, porém essa resposta se manifestou mais rápida (a partir de 6 h) com CK ao invés de AS (a partir de 12 h). Praticamente, em todas as análises, transcritos do gene *SBTX27* prevaleceram em relação àqueles do *SBTX17*. A presença constitutiva e ubíqua de transcritos dos genes da SBTX ao longo do desenvolvimento da planta, a indução da expressão desses genes por elicitores de resposta de defesa e a localização da toxina na superfície dos cotilédones validam o papel de defesa atribuído a SBTX, suscitando a possibilidade de uso dessa proteína na produção de soja resistente ao ataque de fungos de relevância agronômica.

**Palavras-chave:** Proteína da soja; defesa vegetal; indução gênica; *Cercospora kikuchii*; ácido salicílico, qRT-PCR.

## ABSTRACT

Brazil is the second major global soybean producer, whose magnitude is due to its use multiples. However, losses in productivity of soybean grains in the field are still significant, especially those caused by pathogenic fungi. In view of this obstacle, it is important to search natural molecules able to inhibiting the progress of fungal diseases in an environmental friendly practice. Among the soybean molecules which could be used for this purpose, the soybean toxin (SBTX) stands out. SBTX is a protein composed of two subunits (17 and 27 kDa) isolated from seeds with *in vitro* activity against phytopathogenic fungi. The present study aimed to verify the SBTX tissue localization in soybean seed cotyledons, as well as to evaluate the gene expression profile of two SBTX subunits, both in different stages of plant development and in response to treatment with plant defense elicitors. Soybean seeds were grown in a greenhouse and plant tissues harvested at different days. In addition, soybean primary leaves were treated with salicylic acid (SA) or inoculated with the *Cercospora kikuchii* (CK) spores and harvested at different times after the treatments. Based on the N-terminal sequences of the SBTX subunits, primers were designed and their gene expression evaluated by quantitative real-time PCR technique. SBTX tissue localization was performed by immunohistochemistry using anti-SBTX. Transcripts for both SBTX subunits were detected in all plant tissues, predominantly in cotyledons and unifoliate leaves in the early stages of their development, as well as in mature seeds. SBTX was found in the epidermis of the cotyledons. Transcripts were detected for both genes *SBTX17* e *SBTX27* in all tissues collected, but their expression levels were different. The highest transcript levels for both SBTX subunits were found in mature seeds, cotyledons and unifoliate leaves. In cotyledons, SBTX was found in the epidermis. Leaves treated with elicitors showed induction of the corresponding 17 and 27 kDa subunit transcripts, however this response was earlier in the CK treatment (from 6 h) compared to AS treatment (from 12 h). In almost all analyses, the highest transcript levels were found for the 27 kDa subunit. The ubiquitous and constitutive gene expression during plant development, the induction of gene expression by defense response elicitors and the localization on the surface of cotyledons support the role of SBTX in plant defense and its use to produce fungal-resistant transgenic soybean plants.

**Keywords:** Soybean protein; plant defense; gene induction; *Cercospora kikuchii*; salycilic acid; RT-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação taxonômica da soja.....	22
Figura 2 -	Estádios do desenvolvimento da soja.....	24
Figura 3 -	Estimativas para safras futuras de soja.....	28
Figura 4 -	Estimativa da produção mundial de grãos em milhões de toneladas.....	29
Figura 5 -	Mecanismo de ação de defesa vegetal desencadeado por ácido salicílico.....	37
Figura 6 -	Esquema de purificação da SBTX.....	63
Figura 7 -	Esquema de obtenção de anticorpos policlonais anti-SBTX.....	66
Figura 8 -	Plantio de soja em casa de vegetação.....	70
Figura 9 -	Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) do RNA extraído dos tecidos vegetais de soja.....	71
Figura 10 -	Perfil eletroforético em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene do fator de elongação <i>Efla2a</i> .....	72
Figura 11 -	Valores V gerados pelo programa geNorm para normalização dos dados dos tecidos vegetativos, flores e vagens.....	74
Figura 12 -	Valores V gerados pelo programa geNorm para normalização dos dados de sementes.....	75

Figura 13 -	Estabilidade de expressão dos genes potenciais de referência para amostras dos tecidos vegetativos, vagens e flores pelo programa geNorm.....	76
Figura 14 -	Estabilidade de expressão dos genes potenciais de referência para amostras de sementes pelo programa geNorm.....	77
Figura 15 -	Expressão relativa do gene <i>SBTX 17</i> , referente à subunidade de 17 kDa da toxina, ao longo do desenvolvimento da soja.....	78
Figura 16 -	Expressão relativa do gene <i>SBTX 27</i> , referente à subunidade de 27 kDa da toxina, ao longo do desenvolvimento da soja.....	79
Figura 17 -	Expressão relativa do gene <i>SBTX 17</i> , referente à subunidade de 17 kDa da toxina, ao longo do enchimento do grão de soja.....	80
Figura 18 -	Expressão relativa do gene <i>SBTX 27</i> , referente à subunidade de 27 kDa da toxina, ao longo do enchimento do grão de soja.....	81
Figura 19 -	Desenvolvimento da soja em casa de vegetação.....	84
Figura 20 -	Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) do RNA extraído de folhas primárias de plantas de soja submetidas aos tratamentos abiótico e biótico.....	86
Figura 21 -	Perfil eletroforético em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene da actina, evidenciando a qualidade do cDNA produzido na PCR semiquantitativa (35 ciclos).....	87
Figura 22 -	Valores V gerados pelo programa geNorm para normalização dos dados resultantes dos tratamentos com ácido salicílico 5 mM (AS) e <i>C. kikuchii</i> ( $2 \times 10^5$ conídios/mL) (CK).....	89

Figura 23 -	Estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência para análises em amostras de folhas primárias de soja submetidas ao tratamento com ácido salicílico 5 mM, usando o programa geNorm.....	90
Figura 24 -	Estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência para análises em amostras de folhas primárias de soja submetidas ao tratamento com <i>C. kikuchii</i> ( $2 \times 10^5$ conídios/mL), usando o programa geNorm.....	91
Figura 25 -	Expressão relativa dos genes <i>SBTX17</i> , <i>SBTX27</i> e <i>PR3</i> em folhas de soja submetidas aos tratamentos com elicitores abiótico e biótico.....	92
Figura 26 -	Perfil cromatográfico em matriz de DEAE-Celulose.....	94
Figura 27 -	Perfil cromatográfico em matriz de CM-Sepharose.....	95
Figura 28 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (17,5%) da SBTX na presença e ausência de $\beta$ -mercaptoetanol e SDS, revelada com prata.....	96
Figura 29 -	Perfil cromatográfico do antissoro produzido em coelhos imunizados com SBTX após cromatografia de afinidade em matriz de Proteína A–Agarose P2545.....	97
Figura 30 -	Titulação dos anticorpos policlonais anti-SBTX obtidos a partir da imunização do coelho com SBTX.....	98
Figura 31 -	Cortes transversais de cotilédones de soja submetidos à imunolocalização de SBTX.....	99

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais doenças fúngicas de soja.....	31
Tabela 2 -	Famílias conhecidas de PR-proteínas.....	39
Tabela 3 -	Propriedades de SBTX.....	41
Tabela 4 -	Tecidos coletados e seus respectivos estádios de desenvolvimento.....	47
Tabela 5 -	Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa.....	50
Tabela 6 -	Componentes e volumes usados nas reações para validação do cDNA...	51
Tabela 7 -	Sequência de iniciadores dos genes da SBTX.....	53
Tabela 8 -	Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT–PCR de tecidos vegetativos, flores e vagens.....	54
Tabela 9 -	Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT–PCR de sementes em desenvolvimento.....	55
Tabela 10 -	Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT–PCR de folhas tratadas com ácido salicílico 5 mM.....	60
Tabela 11 -	Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT–PCR de folhas tratadas com o fungo <i>C. kikuchii</i> ( $2 \times 10^5$ esporos/mL)...	61
Tabela 12 -	Valores médios das concentrações e relações de absorbâncias do RNA total extraído dos diferentes tecidos de soja, coletados ao longo de seu	

	desenvolvimento.....	69
Tabela 13 -	Relação entre os valores de expressão dos transcritos dos genes <i>SBTX27</i> e <i>SBTX17</i> em diferentes tecidos vegetais, durante estádios distintos de desenvolvimento da soja.....	82
Tabela 14 -	Valores médios das concentrações e relações de absorbâncias dos extratos de RNA total de folhas primárias de soja submetidas aos diferentes tratamentos abiótico e biótico.....	85

---

---



## SUMÁRIO

---

---

<b>1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Soja: usos e aplicações.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Estádios de desenvolvimento da soja.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Histórico e produção da soja no Brasil.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Limitações no cultivo da soja.....</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Principais doenças causadas por fungos na soja.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Estratégias de controle.....</b>	<b>32</b>
<b>2.7</b>	<b>Defesa vegetal.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7.1</b>	<b><i>Moléculas elicitoras da defesa vegetal.....</i></b>	<b>35</b>
<b>2.7.2</b>	<b><i>Defesa mediada por proteínas.....</i></b>	<b>36</b>
<b>2.7.3</b>	<b><i>Toxinas Vegetais.....</i></b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>43</b>

<b>4</b>	<b>MATERIAIS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Sementes.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Fungo.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Reagentes e outros materiais.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Condições de crescimento da soja.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR).....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1</b>	<i>Extração de RNA total.....</i>	<i>46</i>
<b>5.2.2</b>	<i>Quantificação, pureza e integridade do RNA total.....</i>	<i>48</i>
<b>5.2.3</b>	<i>Síntese de DNA complementar (cDNA).....</i>	<i>49</i>
<b>5.2.4</b>	<i>PCR semi-quantitativa.....</i>	<i>49</i>
<b>5.2.5</b>	<i>Desenho dos iniciadores (primers) para RT-PCR.....</i>	<i>52</i>
<b>5.2.6</b>	<i>PCR em tempo real (RT-PCR).....</i>	<i>52</i>
<b>5.3</b>	<b>Plantio em casa de vegetação.....</b>	<b>57</b>
<b>5.4</b>	<b>Obtenção da suspensão de conídios do fungo <i>C. kikuchii</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>5.5</b>	<b>Tratamentos das plantas de soja com elicitores abiótico e biótico.....</b>	<b>58</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise da expressão gênica por RT-PCR.....</b>	<b>58</b>

<b>5.6.1</b>	<b><i>Obtenção do RNA total.....</i></b>	<b>58</b>
<b>5.6.2</b>	<b><i>Síntese de DNA complementar (cDNA).....</i></b>	<b>58</b>
<b>5.6.3</b>	<b><i>Desenho dos iniciadores para RT-PCR.....</i></b>	<b>59</b>
<b>5.6.4</b>	<b><i>RT-PCR.....</i></b>	<b>59</b>
<b>5.7</b>	<b><i>Purificação de SBTX.....</i></b>	<b>62</b>
<b>5.7.1</b>	<b><i>Preparação da farinha de soja.....</i></b>	<b>62</b>
<b>5.7.2</b>	<b><i>Extração e purificação da SBTX.....</i></b>	<b>62</b>
<b>5.7.3</b>	<b><i>Determinação de proteínas.....</i></b>	<b>62</b>
<b>5.7.4</b>	<b><i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....</i></b>	<b>64</b>
<b>5.7.5</b>	<b><i>Produção de anticorpos policlonais anti-SBTX.....</i></b>	<b>64</b>
<b>5.7.6</b>	<b><i>Imunohistoquímica.....</i></b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b><i>RESULTADOS.....</i></b>	<b>68</b>
<b>6.1</b>	<b><i>Propriedades do RNA extraído dos tecidos vegetais.....</i></b>	<b>68</b>
<b>6.2</b>	<b><i>Qualidade do cDNA sintetizado.....</i></b>	<b>68</b>
<b>6.3</b>	<b><i>Padronização dos genes de referência para RT-PCR.....</i></b>	<b>68</b>
<b>6.4</b>	<b><i>Expressão gênica da SBTX avaliada por RT-PCR.....</i></b>	<b>73</b>
<b>6.5</b>	<b><i>Propriedades do RNA extraído das folhas primárias submetidas aos diferentes tratamentos.....</i></b>	<b>83</b>
<b>6.6</b>	<b><i>Qualidade do cDNA sintetizado.....</i></b>	<b>83</b>

<b>6.7</b>	<b>Padronização dos genes de referência para RT-PCR.....</b>	<b>83</b>
<b>6.8</b>	<b>Expressão gênica da SBTX analisada por RT-PCR.....</b>	<b>88</b>
<b>6.9</b>	<b>Acúmulo de SBTX.....</b>	<b>93</b>
<b>6.10</b>	<b>Anticorpos policlonais anti-SBTX.....</b>	<b>93</b>
<b>6.11</b>	<b>Imunohistoquímica.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>108</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>

---

---

## 1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

A soja é considerada a leguminosa da maior importância econômica devido a sua versatilidade de utilizações decorrente da composição elementar de seus grãos, sendo amplamente utilizada na alimentação como uma fonte alternativa de proteínas e, também, na obtenção de óleos comestíveis. Na indústria, essa leguminosa tem sido utilizada na fabricação de cosméticos, adesivos, formuladores de espumas, fibras e revestimentos (BOARD, 2012). Diante de tantas utilidades, essa leguminosa figura como a principal oleaginosa produzida e consumida, sendo o Brasil o segundo maior produtor de soja no cenário mundial.

Para a safra de 2013/2014, foi estimada uma produtividade média brasileira de soja em grão em 3.000 kg/há, mas este valor baixou para 2.865 kg/ha. Desta forma, a produção que, inicialmente era estimada em 87 milhões de toneladas, foi avaliada em 2014 em apenas 86,27 milhões de toneladas (CONAB, 2014). Esse decaimento da produtividade está diretamente ligado a fatores climáticos, ao ataque por herbívoros e às doenças causadas por microrganismos patogênicos. Bilhões de dólares são gastos anualmente na agricultura mundial com manejo e controle químico de fitopatógenos e pragas. No entanto, apenas cerca de 7% dos prejuízos são reduzidos pela ação do controle químico, o qual, além de se mostrar pouco eficiente, vem causando profundo impacto ambiental e desequilíbrio ecológico. Como exemplo, a despeito do surgimento contínuo de novos fungicidas, é estimado que as perdas causadas por fungos fitopatogênicos, no mundo todo, chegam a 20% e, em alguns casos extremos, alcançam 100% (GODOY; MEYER, 2014). Adicionalmente, os problemas não se restringem apenas à perda de grãos. Os custos adicionais desencadeados pela adoção de métodos de controle e as restrições e imposições de barreiras fitossanitárias dificultam ou mesmo inviabilizam a chegada do produto ao mercado.

Ao longo dos anos, foram várias as tentativas de aumento da produtividade dos grãos de soja. Uma estratégia bem sucedida foi o desenvolvimento de cultivares resistentes às condições adversas impostas por fatores bióticos e abióticos. No entanto, a rápida evolução de pragas e patógenos tem tornado inviável a obtenção de genótipos pouco susceptíveis dentro de um curto intervalo de tempo e mesmo aqueles resistentes não dispensam a aplicação de defensivos químicos durante o plantio (CARNIEL; MENOSSO; BALBINOT JUNIOR, 2014). Todavia, a biotecnologia pode contribuir com alternativas sustentáveis para a obtenção de genótipos de alta produtividade e resistentes/tolerantes aos estresses bióticos e abióticos. A identificação de genes de resistência que possam ser transferidos para variedades comerciais e, ainda, a purificação e caracterização de moléculas bioativas capazes de serem utilizadas

como fungicidas são exemplos de estratégias promissoras nesse contexto (BERTHOLDO-VARGAS *et al.*, 2009; MARRA *et al.*, 2009).

A soja possui um arsenal de biomoléculas com potencial biotecnológico para serem usadas na defesa vegetal. Dentre essas moléculas, destaca-se a toxina da soja (SBTX), uma proteína de 44 kDa isolada das sementes dessa leguminosa com ação antifúngica, inibindo o crescimento micelial de *Cercospora sojina* e *Cercospora kikuchii*, causadores de doenças foliares de importância econômica para a soja (VASCONCELOS *et al.*, 2008), além de promover a inibição da germinação de esporos dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium hergueli*, que causam deterioração das sementes durante seu armazenamento. SBTX também foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, demonstrando seu amplo espectro de ação e potencial para o desenvolvimento, em bases biotecnológicas, de uma nova droga antifúngica para a proteção de animais (MORAIS *et al.*, 2010). Essa proteína ainda possui atividade contra insetos, tendo se mostrado tóxica para ninfas de *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus* (SIEBRA, 2004; MORAIS, 2007). No que diz respeito à sua distribuição tecidual, essa proteína está também presente no caule, folha e raiz de plântulas estioladas, além das sementes (SIEBRA, 1998). Ademais, essa proteína foi induzida pelo tratamento das sementes com ácido jasmônico (MORAIS, 2007; 2010).

Reunidas as informações citadas, nosso grupo de pesquisa suscitou a hipótese de que SBTX estaria envolvida no mecanismo de defesa da soja contra diversos agressores. Vários estudos já foram desenvolvidos no sentido de validar ou não essa hipótese. O presente estudo é mais um deles, por se entender que o conhecimento do perfil de expressão gênica das cadeias de SBTX ao longo do desenvolvimento da soja e, também, em plantas submetidas ou não a elicitores biótico e abiótico, bem como de sua localização tecidual, daria uma grande contribuição nesse sentido.

Diante do exposto, seguem as seguintes indagações em relação à SBTX:

- a) Além das sementes, seus transcritos também estariam presentes em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento da soja?
- b) Uma vez que essa proteína é composta por duas subunidades (17 e 27 kDa), seus genes codificadores teriam o mesmo perfil de expressão?
- c) Os seus genes codificadores seriam induzidos pelo tratamento das folhas primárias de plantas de soja com ácido salicílico ou inoculação com esporos do fungo *C. kikuchii*?
- d) Tendo sido purificada de sementes maduras, onde essa proteína estaria localizada nos cotilédones?

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Soja: usos e aplicações**

A soja é uma planta herbácea pertencente à família Fabaceae, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae e ordem Fabales, possuindo crescimento morfológico diversificado, hastes e vagens pubescentes e porte ereto (CAPELLARI – JÚNIOR; RODRIGUES; SOUSA, 1999), conforme visualizada na Figura 1. Essa espécie é amplamente cultivada por toda extensão do Brasil, estando mais concentrada na região Centro-Oeste (CONAB, 2015).

Uma das principais justificativas da ampla disseminação nacional e mundial dessa leguminosa encontra-se no valor nutricional atribuído a suas sementes. Comparada a outras espécies vegetais, os grãos de soja possuem elevado teor de proteínas (38-40%), lipídeos (18%) e carboidratos (30%) e bom balanceamento de aminoácidos essenciais. Em adição, sementes de soja são boas fontes de fósforo, potássio, zinco, ferro, vitaminas do complexo B e da vitamina antioxidante E (BURTON, 1997). Assim, em termos de composição química, a soja é considerada superior a outros produtos de origem vegetal e equivalente a muitos alimentos de origem animal (CÂMARA, 2011).

Além do uso da soja como fonte de proteínas e óleo, ela tem vários outros usos na indústria, tais como na produção de biodiesel, ácidos graxos, plásticos, revestimentos, lubrificantes e fluidos hidráulicos. Nos países asiáticos, como a China, Japão e Indonésia, toda a semente é diretamente consumida como alimento humano, ou incorporada a itens alimentares utilizados pelo homem, tais como tofu, leite e queijo. O consumo da soja como alimento pelo homem está crescendo gradativamente pelo mundo. Recentemente, foi atribuído à alimentação humana a base de soja, benefício de saúde para doenças cardíacas, câncer, osteoporose e menopausa (BOARD, 2012).

### **2.2 Estádios de desenvolvimento da soja**

A soja apresenta desenvolvimento fenológico bem caracterizado e delimitado em etapas. Essas etapas são chamadas de estádios e contribuem para padronizar as fases do ciclo reprodutivo dessa espécie, de modo a permitir a identificação mais precisa de infecções

Figura 1 - Classificação taxonômica da soja



Fonte: USDA (2015).



e doenças ao longo do seu ciclo. Mundialmente, a escala de desenvolvimento fenológico mais amplamente aceita para a soja é a de Fehr e Caviness (1977), sendo também a mais utilizada entre pesquisadores que usam a soja como modelo experimental (FIGURA 2). O desenvolvimento da soja é dividido em dois estágios que se subdividem em estádios. O estágio vegetativo inicia-se a partir da emergência dos cotilédones acima do solo até o florescimento, caracterizando as plantas jovens. Já o estágio reprodutivo, ocorre a partir do florescimento até a maturação completa das sementes, caracterizando as plantas adultas.

O desenvolvimento da soja se inicia a partir absorção de água por suas sementes, culminando no processo de germinação e, conseqüentemente, no crescimento da radícula para baixo, fixando-se no solo. Posteriormente, o hipocótilo, a pequena seção do caule situada entre o nó cotiledonar e a radícula, inicia a sua elongação para a superfície do solo, levando consigo os cotilédones. A fixação da radícula no solo e a elongação do hipocótilo estabelecem uma alavanca que ergue os cotilédones à superfície do solo, caracterizando o estágio de emergência, ou  $V_E$ . Este estágio deve ocorrer entre 5 a 8 dias após a semeadura. Logo após a emergência ( $V_E$ ), ocorre expansão e desdobramento das folhas unifolioladas marcando o início do estágio de abertura dos cotilédones ( $V_C$ ), seguido pelos demais estádios vegetativos numerados ( $V_n$ ). As reservas nutritivas armazenadas nos cotilédones suprem as necessidades da planta jovem durante os primeiros 7 a 10 dias depois de  $V_E$ , ou até próximo ao estágio  $V_1$ . Durante esse período, os cotilédones perdem 70% do seu peso seco.

A partir do estágio  $V_C$ , os estádios vegetativos ( $V$ ) são definidos e numerados à medida que as folhas dos nós superiores se apresentam completamente desenvolvidas. No estágio  $V_1$ , a folha unifoliolada está completamente desenvolvida e já é capaz de realizar fotossíntese, gerando a energia necessária para o desenvolvimento das plantas jovens. A partir do estágio  $V_2$ , ocorre o desenvolvimento da primeira folha trifoliolada.

Os oito estádios R (reprodutivos) são divididos em quatro partes:  $R_1$  e  $R_2$  descrevem o florescimento;  $R_3$  e  $R_4$  o desenvolvimento da vagem;  $R_5$  e  $R_6$  o desenvolvimento da semente e  $R_7$  e  $R_8$  a maturação da planta. Uma melhor visualização desses estádios encontra-se na Figura 2. Durante o estágio reprodutivo, ocorre um período de rápido e constante acúmulo diário das taxas de matéria seca e de nutrientes pela planta no intervalo de estádios de  $R_2$  à  $R_6$ . Essa rápida acumulação de matéria seca e nutrientes pela planta inteira inicia-se nas partes vegetativas (folhas, caules, pecíolos e raízes), deslocando-se gradualmente para as vagens e sementes em formação. No estágio  $R_5$ , o desenvolvimento reprodutivo apresenta desde flores quase abertas até vagens contendo sementes com 11 mm de comprimento (JONES; GONZALEZ; VODKIN, 2010).

Figura 2 - Estádios do desenvolvimento da soja

Período	Estádio	Descrição
Vegetativo	VE	Cotilédones acima da superfície do solo
	VC	Cotilédones completamente abertos
	V1	Folhas unifolioladas completamente desenvolvidas <sup>1</sup>
	V2	Primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida
	V3	Segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida
	Vn	Ante-enésima folha trifoliolada completamente desenvolvida
Reprodutivo	R1	Início do florescimento - Uma flor aberta em qualquer nó do caule <sup>2</sup>
	R2	Florescimento pleno - Uma flor aberta num dos 2 últimos nós <sup>3</sup> do caule com folha completamente desenvolvida
	R3	Início da formação da vagem - Vagem com 5 mm de comprimento num dos 4 últimos nós <sup>3</sup> do caule com folha completamente desenvolvida
	R4	Vagem completamente desenvolvida - Vagem com 2 cm de comprimento num dos 4 últimos nós <sup>3</sup> do caule com folha completamente desenvolvida
	R5	Início do enchimento do grão - Grão com 3 mm de comprimento em vagem num dos 4 últimos nós <sup>3</sup> do caule, com folha completamente desenvolvida
	Subdivisões do estágio R5 *	<ul style="list-style-type: none"> <li>• R5.1 - grãos perceptíveis ao tato (o equivalente a 10% da granação);</li> <li>• R5.2 – 11% a 25% da granação;</li> <li>• R5.3 – 26% a 50% da granação;</li> <li>• R5.4 – 51% a 75% da granação;</li> <li>• R5.5 – 76% a 100% da granação.</li> </ul>
	R6	Grão cheio ou completo - vagem contendo grãos verdes preenchendo as cavidades da vagem de um dos 4 últimos nós <sup>3</sup> do caule, com folha completamente desenvolvida
	R7	Início da maturação - Uma vagem normal no caule com coloração de madura
	R8	Maturação plena - 95% das vagens com coloração de madura

Obs:

<sup>1</sup> Uma folha é considerada completamente desenvolvida quando as bordas dos trifólios da folha seguinte (acima) não mais se tocam.<sup>2</sup> Caule significa a haste principal da planta<sup>3</sup> A expressão 'últimos nós' refere-se aos últimos nós superiores.

Fonte: Fehr; Caviness (1977).

Já o desenvolvimento das sementes dentro das vagens pode ser simplificado por meio da categorização deste processo complexo em três fases temporais sequenciais: a embriogênese, enchimento de grãos e maturação. A embriogênese compreende os estágios de formação do embrião: estágio globular, cordiforme e de torpedo. O primeiro estágio é caracterizado pela intensa divisão celular e pelo formato esférico do embrião, enquanto que no estágio cordiforme há o desenvolvimento dos cotilédones conferindo o formato bilobado ao embrião. No estágio de torpedo, ocorre o alongamento do eixo embrionário e dos cotilédones, juntamente com a extensão simultânea dos meristemas apicais (RAVEN, 2007).

O embrião é composto pelo eixo embrionário e cotilédones. O eixo embrionário, por sua vez, é formado pelos primórdios radicular e caulinar que consistem de meristemas apicais. Os meristemas são tecidos embrionários permanentes, compostos de células que podem se dividir repetidas vezes e estão envolvidas no crescimento do comprimento do corpo da planta. As folhas e o caule são originados a partir do meristema apical caulinar, enquanto que a raiz se origina a partir do meristema apical radicular (RAVEN, 2007).

Procedendo à embriogênese, o enchimento de sementes consiste num evento no qual ocorre o seu crescimento, havendo a síntese da maior parte dos compostos de reservas utilizados na germinação. Os eventos metabólicos que ocorrem nesta etapa determinam a composição de reserva global da semente. Esse processo é caracterizado pelas rápidas alterações metabólicas e morfológicas (tamanho, peso e cor), compreendendo os processos celulares que incluem a expansão das células e a fase inicial da dessecação (ASAKURA *et al.*, 2012). A síntese de proteínas de reserva ocorre ao término da divisão celular, num período entre 14 e 16 dias após a antese, quando todo o crescimento adicional só se dá pela expansão celular e acúmulo de compostos de reservas (HERMAN; LARKINS, 1999). Na maturação, aproximadamente 41% do peso seco da semente de soja tratam-se de proteínas de reserva (HILL; BREIDENBACH, 1974), sendo a glicinina e a  $\beta$ -conglícinina dominantes (ROBERTS; BRIGGS, 1965; THANH; SHIBASAKI, 1976).

Nos últimos anos, a transcriptômica tem sido uma ferramenta utilizada para investigar as alterações na expressão gênica durante o desenvolvimento da semente em cereais [milho (*Zea mays*; WANG *et al.*, 2012), arroz (*Oryza sativa*; XUE; ZHANG; XUE, 2012)], leguminosas [soja (JONES; GONZALEZ; VODKIN, 2010; ASAKURA *et al.*, 2012; JONES; VODKIN, 2013)] e oleaginosas [*Arabidopsis thaliana*; LE *et al.*, 2010)]. Essas investigações permitiram a obtenção de maiores informações acerca de que vias são atuantes ao longo das diversas etapas que compõem o processo de desenvolvimento das sementes.

### 2.3 Histórico e produção da soja no Brasil

Em 1882, o professor da Escola de Agronomia da Bahia, Gustavo Dutra trouxe a soja dos Estados Unidos para o Brasil e realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares (SHURTLEFF; AOYAGI, 2009). Nessa época, a soja era estudada como forrageira no Brasil, assim como nos Estados Unidos, produzindo mais grãos para consumo de animais das propriedades rurais, do que como planta produtora de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais.

Apesar do primeiro registro de cultivo de soja no Brasil ter sido em 1914, no município de Santa Rosa, RS, foi apenas na década de 40 que ela, de fato, adquiriu certa importância econômica. Em 1941, esse município foi registrado no Anuário Agrícola do RS contendo uma área cultivada de 640 hectares, cuja produção e rendimento foram 450 toneladas e 700 kg/ha, respectivamente. Ainda nesse ano, foi instalada a primeira indústria processadora de soja do País (Santa Rosa, RS), o que culminou na entrada do Brasil como produtor de soja nas estatísticas internacionais, em meados de 1949 (GAVIOLI, 2012).

O cultivo de soja no Brasil vem crescendo de tal forma no cenário mundial que, em 1958, representava apenas 0,5% da produção e, atualmente, para a safra de 2015, a produção brasileira é cerca de 30% do grão produzido mundialmente (FIESP, 2015). Esse crescimento, de quase 260 vezes, no transcorrer de apenas quatro décadas, desencadeou uma cadeia de mudanças sem precedentes na história do país, como, por exemplo, o surgimento da agricultura comercial no Brasil. Consequentemente, desencadeou a aceleração da mecanização das lavouras brasileiras, a modernização do sistema de transportes, tecnificação de outras culturas (destacadamente a do milho), profissionalização e incremento do comércio internacional. Tais modificações ainda culminaram na aceleração da urbanização nacional, incluindo a sua interiorização, consequente da expansão da agro-indústria que, por sua vez, auxiliou no desenvolvimento da avicultura e da suinocultura brasileiras (EMBRAPA, 2009a).

Segundo dados fornecidos pela USDA (2015), a produção mundial de soja atingiu, para a safra de 2014/2015, valores de 315,1 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos, Brasil e Argentina responsáveis por 82% de toda a produção dos grãos. O Brasil se destaca como segundo produtor, atingindo valores de 94,5 milhões de toneladas, ficando atrás dos Estados Unidos que produziram para a mesma safra cerca de 108 milhões de toneladas de grãos de soja. Contudo, projeções indicam que o Brasil aumentará sua área plantada em 18,3%, sua produção em 42,8% e sua produtividade em 20,7%, atingindo valores totais de

123 milhões de toneladas de grãos de soja na safra de 2023/2024 (FIGURA 3), podendo, então, se destacar como o maior produtor de soja no mercado mundial.

Dentro do cenário de produção de grãos nacional, a produção de soja se destaca em terceiro lugar (FIESP, 2013), ficando atrás das culturas de milho e do trigo (FIGURA 4). Para o Brasil, o complexo soja tem expressiva importância econômica, desempenhando papel fundamental para o produto interno bruto (PIB), gerando divisas e empregos, além de envolver um amplo número de agentes e organizações ligados aos mais diversos setores econômicos (EMBRAPA, 2009). A receita estimada proveniente das exportações do complexo da soja de 2014 foi de 23,27 bilhões de dólares, representando mais de 10% do total exportado pelo país. Todavia, mais importante do que os benefícios diretos provenientes das exportações, são os benefícios indiretos derivados de sua extensa cadeia produtiva, que superam em mais de cinco vezes esse montante (CONAB, 2015).

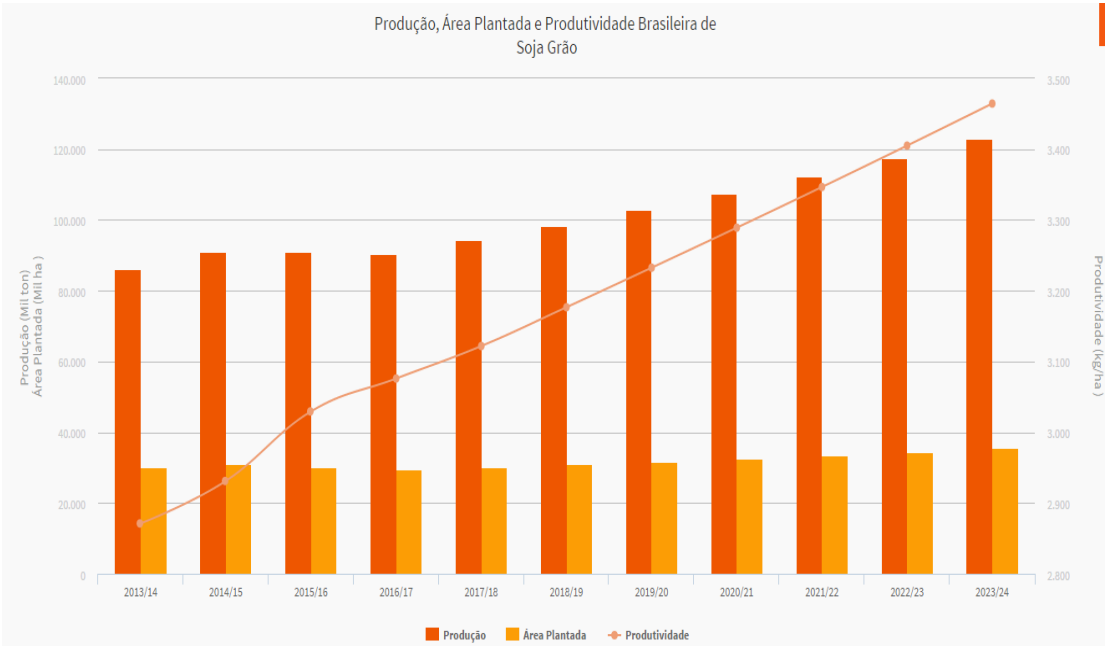
## **2.4 Limitações no cultivo da soja**

A produtividade média brasileira de soja em grãos era estimada inicialmente em 3.000 kg/ha para a safra 2013/2014. No entanto, a produtividade média baixou para 2.865 kg/ha, ou seja, 2,5% menor que a da safra anterior (2012/2013). Desta forma, a produção que, inicialmente era estimada em 87 milhões de toneladas para a safra 2013/2014, foi avaliada em julho de 2014 em apenas 86,27 milhões de toneladas (CONAB, 2014).

Os fatores responsáveis pela diminuição da produtividade dos grãos de soja enquadram-se em dois grupos: abióticos e bióticos. Os fatores abióticos caracterizam-se por toda influência causada aos seres vivos que sejam derivados de aspectos físicos, químicos ou físico-químicos do meio ambiente, como a temperatura, umidade e salinidade. Em 2012, por exemplo, condições climáticas desfavoráveis ocorridas principalmente na Região Sul reduziram a produção esperada em 1,8% frente ao segundo levantamento do ano de 2008 (CONAB, 2008). Para o ano de 2050, a projeção é ainda mais assustadora, já que mudanças climáticas poderão reduzir 44% do rendimento de grãos de soja produzidos na região Amazônica (LAPOLA; SCHALDACH; ALCAMO, 2011).

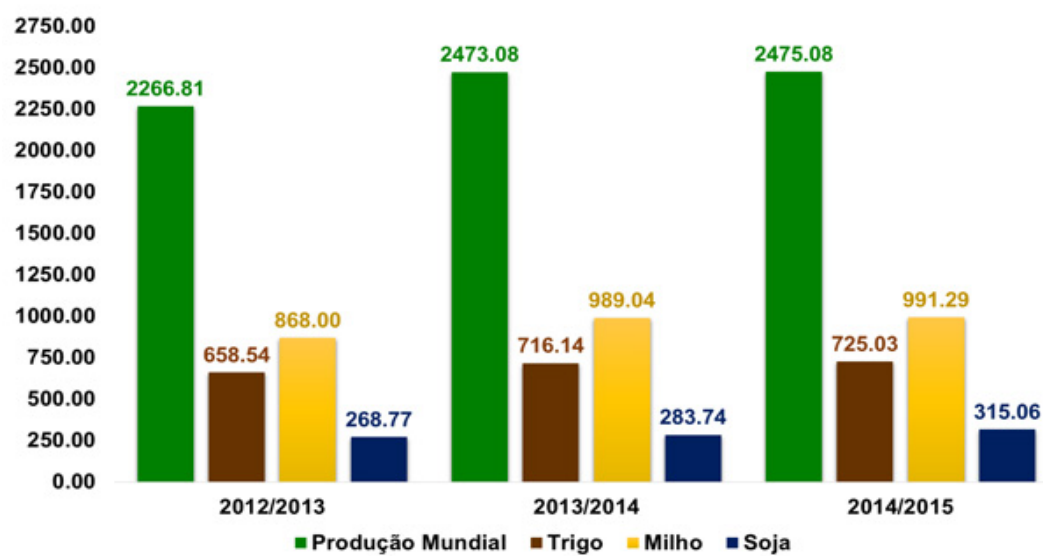
Já os fatores bióticos são caracterizados pela influência de seres vivos, nos quais se incluem os agentes causais de doenças, tais como vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos, afetando raízes, folhas, caules e sementes, sendo, muitas vezes, tecido-específicos (GROSSI-DE-SÁ; PELEGRINI; FRAGOSO, 2011). A cultura da soja está sujeita a mais de 40 doenças causadas pelos agentes acima citados e a importância econômica de cada doença

Figura 3 - Estimativas para safras de soja



Fonte: FIESP (2013).

Figura 4 - Estimativa da produção mundial de grãos em milhões de toneladas



Fonte: FIESP (2013).

varia de acordo com o ano e a região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As pragas são responsáveis, em média, por cerca de 42,1% das perdas na produção agrícola, sendo os fungos fitopatogênicos responsáveis por cerca de 20% dos danos (KREYCI; MENTEN, 2013). Estes são organismos capazes de utilizar quase todos os tipos de superfície (peles, folhas, matéria em decomposição etc.) para seu desenvolvimento.

## 2.5 Principais doenças causadas por fungos na soja

Os tecidos vegetativos de soja podem ser atacados por diversos fungos, sendo as partes aéreas infectadas por, pelo menos, nove diferentes espécies de fungos (ROY; BAIRD; ABNEY, 2001). A EMBRAPA já identificou cerca de 30 doenças na soja causadas por fungos, sendo elas responsáveis por perdas agrícolas anuais que chegam a mais de dois bilhões de dólares (EMBRAPA, 2009). Infelizmente, esse número continua aumentando e levando a perdas anuais de produção de até 20% e, em alguns casos extremos, atingindo 100%. Adicionalmente, os problemas não se restringem apenas à perda de grãos. Os custos adicionais desencadeados pela adoção de métodos de controle e as restrições e imposições de barreiras fitossanitárias dificultam ou mesmo inviabilizam a chegada do produto ao mercado. As principais doenças causadas por fungos que assolam plantações de soja estão resumidas na Tabela 01.

Dentre essas doenças, destacam-se aquelas causadas pelos fungos do gênero *Cercospora*. O fungo *Cercospora sojina* Hara é o microrganismo causador da doença mancha olho-de-rã. Trata-se de uma doença que causa grandes perdas econômicas na sojicultura devido à redução da área foliar fotossintética, desfoliação prematura e danos às sementes. O estágio favorável de infecção por esse fungo é a partir do início do florescimento (AKEM; DASHIEL, 1994).

Outro fungo do gênero *Cercospora* que ataca tanto folhas como sementes é o fungo *C. kikuchii*. Isoladamente, esse patógeno pode provocar perda do rendimento em torno de 45%, de acordo com o potencial produtivo da cultura, consequência da desfolha prematura da planta, que leva a uma redução da granação na ordem de 30%. Além disso, este fungo também causa nas sementes uma descoloração que ocasiona a desvalorização do lote, tanto para uso industrial como também para semeadura (RODRIGUES, 2009). As sementes infectadas frequentemente apresentam rachaduras, por onde podem penetrar outros patógenos. Os sintomas nas folhas, hastes e vagens geralmente passam despercebidos ou são



Tabela 1 – Principais doenças fúngicas de soja

Localização	Nome popular	Agente da doença
Folhas	Crestamento foliar de Cercospora	<i>Cercospora kikuchii</i>
	Ferrugem “americana”	<i>Phakopsora meibomia</i>
	Ferrugem “asiática”	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>
	Mancha foliar de Alternaria	<i>Alternaria sp.</i>
	Mancha foliar de Ascochyta	<i>Ascochyta sojae</i>
	Mancha foliar de Myrothecium	<i>Myrothecium roridum</i>
	Mancha parda	<i>Septoria glycines</i>
	Mancha “olho-de-rã”	<i>Cercospora sojae</i>
	Míldio	<i>Peronospora manshurica</i>
	Mancha foliar de Phyllosticta	<i>Phyllosticta sojicola</i>
	Mancha alvo	<i>Corynespora cassiicola</i>
	Mela ou requeima da soja	<i>Rhizoctonia solani</i> (anamórfica) <i>Thanatephorus cucumeris</i> (teleomórfica)
	Oídio	<i>Microsphaera diffusa</i>
Haste, vagem e sementes	Antracnose	<i>Colletotrichum dematium</i> var. <i>truncata</i>
	Cancro da haste	<i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>meriodionalis</i> (teleomórfica) <i>Phomopsis phaseoli</i> f. sp. <i>meriodionalis</i> (anamórfica)
	Mancha púrpura da semente	<i>Cercospora kikuchii</i>
	Seca da haste e da vagem	<i>Phomopsis</i> spp.
	Seca da vagem	<i>Fusarium</i> spp.
	Mancha de levedura	<i>Nematospora coliri</i>
	Podridão branca da haste	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

Fonte: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca.htm>.

confundidos com outras doenças (OMAFRA, 2009). Adicionalmente, esse fungo juntamente com *Septoria glycines* Hemmi podem ocasionar perdas de produtividade de grãos ainda mais elevadas. Esse dano pode ser bem maior quando associado às demais doenças que surgem no final de ciclo, mas que não atacam somente nesse estágio, como a antracnose, mancha olho-de-rã e oídio (ALMEIDA *et al.*, 2005).

## 2.6 Estratégias de controle

Várias estratégias são adotadas para minimizar os danos causados por pragas nas lavouras. Essas estratégias são baseadas em métodos de manejo, genéticos, químicos e biológicos. Os métodos de manejo consistem na utilização de cultivares de ciclo precoce, semeaduras no início da época recomendada, eliminação de plantas voluntárias de soja, ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário e no monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura (TECNOLOGIAS, 2011).

Quanto à estratégia genética, destaca-se o uso de genótipos resistentes. Contudo, há uma grande dificuldade na obtenção de genótipos pouco susceptíveis, em um curto intervalo de tempo, devido à rápida evolução de pragas e patógenos. Além disso, mesmo os genótipos resistentes, estes não dispensam a aplicação de defensivos químicos durante o plantio (CARNIEL; MENOSSO; BALBINOT JUNIOR, 2014).

O controle químico, por sua vez, consiste na aplicação periódica de fungicidas, sendo os mais comumente usados em lavouras de soja o metil benzimidazol carbamato (MBC, benzimidazóis), os inibidores da demetilação (DMI, triazóis), os inibidores de quinona oxidase (QoI, estrobilurinas) e, mais recentemente, a nova geração de moléculas inibidoras da succinato desidrogenase. Contudo, essa abordagem encontra problemas, tais como sua toxicidade para outros setores da cadeia alimentar e o aparecimento de espécies de fungos resistentes ao tratamento. Atualmente, não há estratégia anti-resistência sendo utilizada de forma efetiva no manejo de fungicidas. A medida mais eficiente para retardar o aparecimento de resistência de fungos, seria limitar o número de aplicações, o que representa um grande desafio em função da extensa janela de plantio e da semeadura de soja após soja, fazendo com que, em algumas regiões, ocorram até 12 aplicações de fungicidas na safra, o que exerce uma alta pressão de seleção de resistência (GODOY; MEYER, 2014).

Diante das colocações expostas, verifica-se que, apesar dos avanços tecnológicos em relação ao plantio e colheita da soja, as perdas ainda são consideráveis. Assim, emerge a necessidade de uma estratégia alternativa para amenizar, ou mesmo erradicar, doenças

causadas por fungos em soja, como a prospecção e uso de genes de defesa no controle de patógenos (BERTHOLDO-VARGAS *et al.*, 2009; MARRA *et al.*, 2009). Essa abordagem envolve a identificação, caracterização e clonagem de genes envolvidos na defesa vegetal, cujos produtos (proteínas ou metabólitos secundários) são capazes de promover a inibição da germinação e/ou do crescimento de estruturas fúngicas.

Pesquisas recentes, envolvendo técnicas de biologia molecular e biotecnologia com foco na interação patógeno e hospedeiro, têm permitido identificar, caracterizar e clonar genes envolvidos na defesa de plantas. Adicionalmente, essas técnicas têm permitido conhecer as funções de produtos e os mecanismos de defesa associados em muitas espécies vegetais (CASASSOLA *et al.*, 2015). Os prováveis candidatos a serem (ou que estão sendo) utilizados no desenvolvimento de espécies resistentes são genes envolvidos na expressão de produtos que: a) são diretamente tóxicos para os fungos ou que interferem em seu crescimento; b) destroem ou neutralizam parte do arsenal bioquímico do patógeno; c) aumentam a defesa estrutural dos vegetais; d) liberam sinais que controlam as respostas de defesa e/ou e) derivam de genes de resistência (*R*) envolvidos no reconhecimento dos genes *Avr* de patógenos (DAGUERRE *et al.*, 2014). Para isso, os mecanismos moleculares envolvidos desde a transcrição gênica até a tradução, além da identificação de vários metabólitos, são de grande importância (NOURI; TOORCHI; KOMATSU, 2011). A conclusão do projeto genoma da soja, em 2008, pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos, juntamente com o Instituto de Genomas, gerou uma série de dados, os quais têm subsidiado avanços nessa área. De posse do genoma sequenciado da soja, genes responsáveis por determinadas características poderão ser identificados e, assim, melhores cultivares serão disponibilizadas para o produtor. Essas características podem incluir, por exemplo, aumento na produtividade, incremento no conteúdo de óleo para produção de biodiesel, melhoria na digestibilidade para animais e humanos, melhoria da qualidade nutricional, tolerância à seca, resistência a pragas e a doenças específicas nas diferentes regiões onde a soja é cultivada, dentre outras (CARNIEL; MENOSSO; BALBINOT JUNIOR, 2014).

## **2.7 Defesa vegetal**

Tratando-se de organismos sésseis, as plantas sofreram uma forte pressão evolutiva ao longo do tempo levando ao desenvolvimento de mecanismos de defesa sofisticados voltados ao combate de organismos potencialmente patogênicos, aos quais são constantemente expostas (PENG *et al.*, 2011). Embora o sistema de defesa vegetal não seja mediado por

anticorpos, como ocorre em mamíferos, as plantas são capazes de ativar uma variedade de barreiras de defesa, incluindo reforços na parede celular, acúmulo de compostos com ação antimicrobiana e pequenas moléculas derivadas do metabolismo secundário (KLIEBENSTEIN, 2014).

A defesa passiva consiste em mecanismos físicos e químicos e é constitutiva na planta a fim de retardar a entrada e infecção microbiana. É composta por barreiras estruturais e químicas pré-formadas, incluindo ceras, cutina, suberina, lignina, compostos fenólicos, celulose, calose e proteínas da parede celular. Já a defesa ativa, também denominada defesa induzida, requer a síntese de proteínas, sendo regulada por vias de sinalização complexas e interconectadas que culminam em mudanças moleculares, bioquímicas e morfológicas, tais como a explosão oxidativa, expressão de genes de defesa, produção de compostos antimicrobianos e/ou morte celular programada (TANG *et al.*, 2013).

A habilidade de perceber e orquestrar uma resposta rápida ao ataque de um patógeno é indispensável para sobrevivência da planta. Esses organismos desenvolveram um aprimorado sistema de defesa que se inicia a partir da detecção de padrões moleculares associados ao patógeno (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs,) via receptores de membrana, resultando na imunidade ativada por PAMPs (*PAMP-Triggered Immunity*, PTI). A PTI ocorre dentro de minutos seguidos da percepção de PAMPs por receptores de membrana da célula vegetal e leva à uma série de respostas metabólicas, como a produção de espécies reativas de oxigênio e reprogramação da transcrição (DODDS; RATHJEN, 2010). A reprogramação da expressão gênica relacionada à PTI é mediada, em parte, pela família *WRKY* de fatores de transcrição, envolvidos tanto na reprogramação positiva como negativa (RUSHTON *et al.*, 2010). Respostas tardias à ativação da PTI incluem deposição de calose na parede celular vegetal perto do sítio de infecção, bem como inibição do crescimento da plântula (GOMEZ-GOMEZ; FELIX; BOLLER, 1999; BOLLER; FELIX, 2009).

Acredita-se a PTI seja suficiente para combater apenas microrganismos não patogênicos e que ela seja suprimida por efetores virulentos secretados pelos patógenos na célula vegetal, desencadeando a doença (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; XIN; HE, 2013). Em contra resposta, as plantas desenvolveram genes de resistência (R) para reconhecer tais efetores e ativar uma resposta de defesa mais potente, a imunidade ativada por efetores (*Effectors-Triggered Immunity*, ETI) que, geralmente, resulta na resposta que causa morte celular programada conhecida como resposta hipersensitiva (*Hypersensitive Response*, HR) no tecido infectado (CAPLAN; PADMANABHAN; DINESH-KUMAR, 2008). A ETI também pode acionar uma segunda resposta de defesa em tecidos não infectados, culminando

na resposta sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (FU *et al.*, 2012). Assim, unindo os mecanismos bem elaborados envolvidos nas respostas de defesa PTI e ETI, as plantas são capazes de sobreviver no meio ambiente.

### 2.7.1 - Moléculas elicitoras da defesa vegetal

Existem diversas moléculas capazes de induzir respostas de defesa nas plantas, como os compostos produzidos por diferentes patógenos e indutores químicos, incluindo alguns fitohormônios (YANG *et al.*, 2011). Os hormônios vegetais são pequenas moléculas que, em pequenas concentrações, são requeridas pelas plantas e regulam as respostas de crescimento, reprodução e defesa. Neste último processo, é relatado que essas moléculas desempenham importantes papéis na regulação precisa de respostas imunes, tanto local como sistêmica, para coordenar a defesa contra diversos tipos de patógenos e em diferentes partes da planta (PIETERSE *et al.*, 2012; WASTERACK, 2014).

Dentre os fitormônios amplamente estudados, destaca-se o ácido salicílico (AS), um composto fenólico que foi demonstrado ser atuante em muitos processos metabólicos na planta, tais como crescimento, desenvolvimento, senescência e respostas a estresses (RIVAS-SAN VINCENTE; PLASENCIA, 2011). Esse composto é reconhecido por seu papel na defesa local e induzida contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos e no estabelecimento da SAR (FU; DONG, 2013). Sua síntese ocorre nos plastídios através de duas rotas do corismato. A primeira delas ocorre através da isocorismato sintase (ICS), sendo uma rota atuante em mais de 90% do AS que é produzido durante a ativação de respostas a estresses (WILDERMUTH *et al.*, 2001). A segunda rota usa a via mediada pela fenilalanina amônia-liase (PAL) (LEE; LEON; RASKIN, 1995).

O ataque do patógeno resulta no aumento da biossíntese de ácido salicílico através das vias ICS/PAL nos plastídios. Então a enzima AS metil transferase catalisa a conversão de ácido salicílico para metil salicilato, que se difunde no citoplasma, onde é convertido novamente em AS pela atividade esterásica de SABP2 (*Salicylic Acid Binding Protein 2*). O aumento nos níveis desse hormônio no citoplasma desencadeia a transcrição de genes de defesa, processo mediado por receptores de AS, conhecidos como *NPR1* (*Nonexpressor of Pathogenesis Related Proteins 1*). Na ausência de estresses, essas proteínas são encontradas em sua forma de oligômeros no citoplasma e na presença de AS há a liberação de seus monômeros que se translocam para o núcleo onde ativam a expressão de genes de defesa (TADA *et al.*, 2008; ATTARAN; HE, 2012). Uma vez no núcleo, NPR1 se liga a fatores de

transcrição e é fosforilada pela atividade quinase do complexo de iniciação da transcrição. Posteriormente, ocorre a ubiquitinação da NPR1 fosforilada pelo proteossoma, desencadeando a expressão de genes responsivos ao AS (KUMAR, 2014). O mecanismo de ação geral pelo qual o ácido salicílico confere resistência às plantas está mostrado na Figura 5.

Além de fitohormônios, elicitores bióticos como microrganismos são capazes de desencadear mecanismos envolvidos na defesa da planta, seja pelo reconhecimento do hospedeiro de PAMPs, como de efetores de virulência, culminando na PTI e ETI, respectivamente e levando à transcrição de genes de defesa. Pesquisas mais recentes trazem em seu escopo a indução de proteínas de defesa em plantas submetidas a tratamentos com patógenos. Em soja, por exemplo, já foram detectados transcritos de proteínas de defesa em folhas e sementes de plantas inoculadas com os fungos *C. kikuchii* e *Diaporthe phaseolorum* (UPCHURCH; RAMIREZ, 2010).

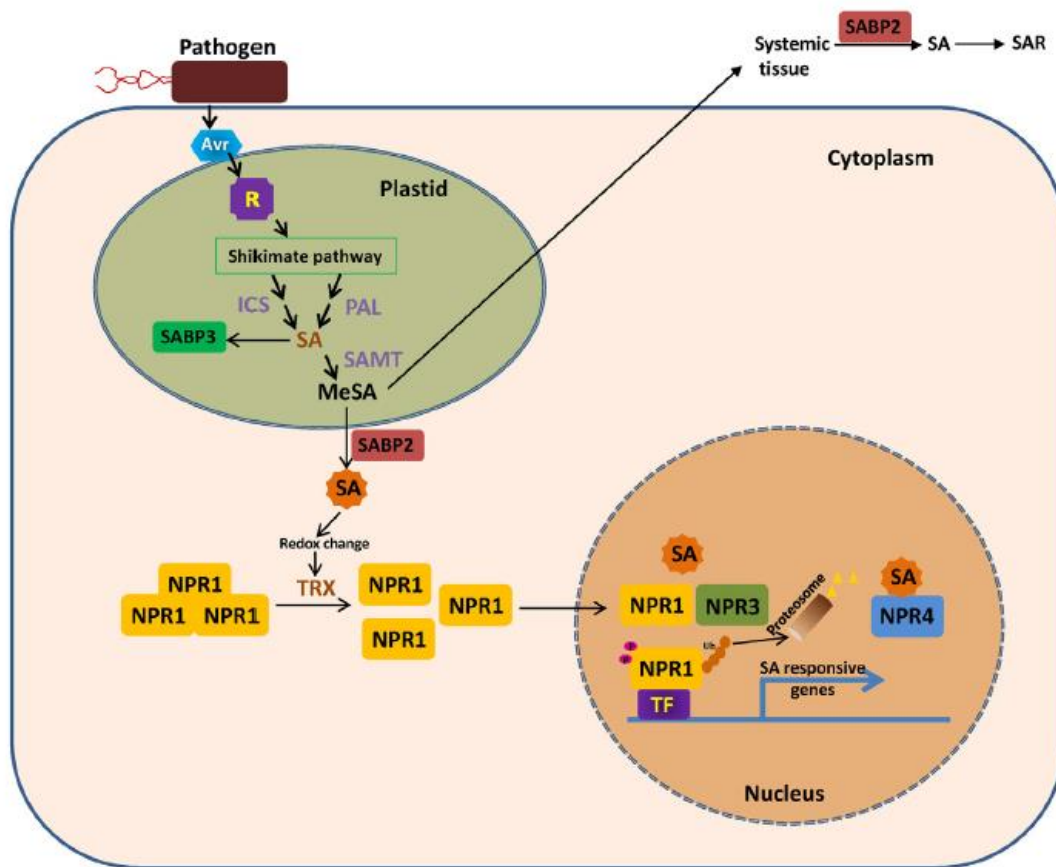
Similarmente, moléculas oriundas da estrutura de patógenos ou secretadas por eles podem atuar como elicitores de defesa. O tratamento de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) com galactomanana sulfatada de *Adenanthera pavonina*, por exemplo, resultou em aumentos expressivos nos teores das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase e peroxidase alternativa. Ademais, esse carboidrato também foi capaz de amenizar a severidade da doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (VARELA, 2012).

### **2.7.2 - Defesa mediada por proteínas**

Embora diversas sejam as moléculas que participam do sistema de defesa, as proteínas merecem destaque devido, principalmente, à potencialidade de suas aplicações na agricultura, como a produção de espécies agrícolas geneticamente melhoradas e resistentes a insetos e doenças (SHAH *et al.*, 1995). Suas propriedades bioquímicas conferem um amplo espectro de atividades biológicas, permitindo que atuem como linha de frente na prevenção e combate à herbivoria e doenças.

Entre as moléculas que participam do sistema de defesa vegetal, pode ser citado um vasto número de peptídeos e proteínas, compreendendo lectinas, inibidores de proteases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs tipos 1 e 2), etc (CARVALHO; GOMES, 2009; STIRPE, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; JAMALA *et al.*, 2015), capazes de conferir proteção contra o ataque de pragas e patógenos. Dentre estes compostos envolvidos na defesa vegetal, destacam-se as proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). As PR-proteínas

Figura 5 - Mecanismo de ação de defesa vegetal desencadeado por ácido salicílico



Fonte: KUMAR (2014).

(*Pathogenesis Related Proteins*) são produtos dos genes *PR* e, segundo van Loon, Rep e Pieterse (2006), tratam-se de moléculas induzidas pela ação de compostos sinalizantes, como os hormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, possuem atividade antimicrobiana *in vitro* via ação hidrolítica na parede celular e toxicidade, podendo, ainda, estarem envolvidas na sinalização da defesa. Essas proteínas foram intensamente estudadas e compiladas em 17 famílias (Tabela 02). A classificação das famílias foi baseada em propriedades bioquímica e biológicas. De forma geral, as PR-proteínas foram agrupadas da seguinte forma:  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) e as endoquitinases (PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11) atuando como moléculas antifúngicas; inibidores de proteases (PR-6) e quitinases atuando na defesa contra insetos herbívoros e nematoides. As proteínas integrantes da classe 8 são lisozimas e podem ser atuantes contra bactérias, enquanto que as defensinas (PR-12), tioninas (PR-13) e algumas das proteínas transferidoras de lipídeos (PR-14) possuem atividades antifúngica e antibacteriana. Já membros da classe 1 e proteínas taumatinas-like (PR-5) são associadas às atividades contra oomicetos. As PR-7 são endoproteases que podem estar envolvidas na dissolução da parede celular microbiana. As PR-9, por sua vez, tratam de um tipo específico de peroxidase que atuam no reforço da parede celular vegetal, catalisando sua lignificação e aumentando a resistência da planta contra vários patógenos. As PR-10 são caracterizadas por sua atividade ribonucleásica e as PR-17 pela atividade metaloproteásica. Por fim, as PR-15 e PR-16 tratam-se de oxalato oxidases e oxalato oxidases-like, respectivamente, apresentando atividade de superóxido dismutase. Essas proteínas geram peróxido de hidrogênio que é tóxico para diversos tipos de agressores ou pode direta ou indiretamente estimular resposta de defesa na planta (van LOON; REP; PIETERSE, 2006). Vale ressaltar que nem todas as famílias são representadas em todas as espécies de plantas e a ocorrência e propriedade de diferentes membros dentro da mesma família podem diferir significativamente.

### 2.7.3 - Toxinas Vegetais

Dentro do arsenal de proteínas atuantes na defesa vegetal, destacam-se, também, as toxinas, moléculas capazes de interferir negativamente em algum parâmetro biológico do organismo, que tenha entrado em contato com essas macromoléculas, através de vias específicas (endovenosa, intraperitoneal, oral etc). A toxicidade de proteínas vegetais foi relatada já em meados de 1888, quando Stillmark (Estônia) observou que extratos de *Ricinus communis* eram extremamente tóxicos para animais, tendo sido essa toxicidade posteriormente atribuída a uma RIP, chamada de ricina (HARTLEY; LORD, 2004).



Tabela 2 - Famílias conhecidas de PR-proteínas

<b>Família</b>	<b>Propriedade</b>	<b>Genes</b>
PR-1	Desconhecida	<i>Ypr1</i>
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Quitinase tipo I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Taumatina-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Inibidor de protease	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinase tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Quitinase, tipo I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	Tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Proteína transferidora de lipídio	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Oxalato oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Oxalato-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Desconhecida	<i>Ypr17</i>

Fonte: van LOON; REP; PIETERSE (2006).

Ainda em 1981, Carlini e Guimarães isolaram uma proteína tóxica de sementes de *Canavalia ensiformis*, capaz de induzir convulsões e morte quando administrada pela via intraperitoneal ou endovenosa em ratos ou camundongos - DL<sub>50</sub> de 2 mgP/kg de massa corporal - denominada canatoxina. Embora suas características funcionais e tóxicas tenham sido primeiramente identificadas em mamíferos, trabalhos posteriores mostraram que essa proteína também apresenta ação inseticida contra espécies de importância agrícola, tais como *Rhodnius prolixus*, *C. maculatus*, *Nezara viridula* e *D. peruvianus* (CARLINI *et al.*, 1997; CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; STANIÇUASKI *et al.*, 2005).

Quanto às proteínas tóxicas da soja, Liener (1951) iniciou os estudos de toxicidade, ao injetar por via intraperitoneal o extrato bruto aquoso preparado a partir de suas sementes em camundongos e verificar sua letalidade para esses animais. Entretanto, o isolamento de um princípio ativo relacionado à toxicidade aguda ocorreu apenas décadas mais tarde, por Vasconcelos e colaboradores (1994), que purificaram uma neurotoxina proteica de sementes de soja, denominada soyatoxina, apresentando uma massa molecular de 21 kDa (SYTX). Trata-se de uma proteína tipo CNTX-like, capaz de reagir com anticorpos produzidos contra CNTX e, também, de induzir convulsões e morte quando injetada em camundongos por via intraperitoneal (DL<sub>50</sub> 7-8 mg/kg de peso corpóreo). Além disso, SYTX foi capaz de produzir dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas precedendo a morte do animal.

Outra toxina foi purificada a partir de sementes de soja, denominada Gm-TX (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Essa proteína apresenta massa molecular de 28 kDa e possui atividade tóxica (DL<sub>50</sub> 4,5 mg/kg de peso corpóreo) por via intraperitoneal para camundongos, com a mesma sintomatologia e sinais clínicos descritos anteriormente para SYTX. A Gm-TX é exsudada por sementes de soja e apresenta potente atividade nematocida contra *Meloidogyne incognita*. Essa proteína ainda se mostrou capaz de alterar negativamente diversos parâmetros do ciclo biológico de *Callosobruchus maculatus* (emergência, índice de crescimento e tempo médio de desenvolvimento), além de induzir mortalidade em *Dysdercus peruvianus*.

Outra toxina isolada de sementes de soja é a SBTX (TABELA 03), uma proteína com massa molecular de 44 kDa que, em condições desnaturantes, apresenta duas subunidades, uma de 27 e outra de 17 kDa, unidas por pontes dissulfeto. Anticorpos anti-SBTX apresentaram reação cruzada com SYTX e CNTX, mostrando que essas toxinas possuem determinantes antigênicos comuns (VASCONCELOS *et al.*, 2008). SBTX apresenta uma DL<sub>50</sub> de 6,0 e 5,6 mg/kg de peso corpóreo, quando administrada em camundongos pelas vias intraperitoneal e intravenosa, respectivamente.

Tabela 3 - Propriedades de SBTX

Propriedades	SBTX
Mr (SDS-PAGE)	
Nativa	44 kDa
Subunidades	27; 17 kDa
$\alpha$ -hélice	35%
Folha- $\beta$	13%
Voltas	27%
Estruturas não ordenadas	25%
pI	8,2
Sequência NH <sub>2</sub> -terminal	PNPKVFFDMTIGGQSAGRIVMEEYA (cadeia de 17 kDa) ADPTFGFTPLGLSEKANLQIMKAYD (cadeia de 27 kDa)
Carboidratos	5%
Coeficiente de extinção	6,3
Estabilidade	0,005 M DTT/4 °C
DL <sub>50</sub> (mg/kg de peso corpóreo do camundongo)	5,6

Fonte: Própria autora.

Em decorrência da sintomatologia, como dispneia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas, precedendo a morte do animal, esta toxina também foi classificada como uma neurotoxina (VASCONCELOS *et al.*, 2008). O sequenciamento da extremidade NH<sub>2</sub>-terminal de SBTX mostrou que a subunidade de massa molecular de 27 kDa apresenta 80% de identidade com a sequência de aminoácidos da proteína SC24, ao passo que a subunidade de 17 kDa mostra identidade de 96% com uma ciclofilina também presente em sementes de soja. Além de sua atividade tóxica para camundongos, SBTX foi capaz de exercer efeitos tóxicos aos insetos *D. peruvianus* e *C. maculatus* e de inibir o crescimento micelial de *C. sojae* e *C. kikuchii*, bem como dos fungos *A. niger* e *P. herquei*, evidenciando o potencial biotecnológico dessa proteína contra fungos fitopatogênicos. Ademais, essa proteína foi induzida em sementes embebidas em soluções com concentrações crescentes de ácido jasmônico, tal como ocorre com muitas proteínas relacionadas à patogênese (MORAIS, 2007; 2010). SBTX atua de forma inespecífica tanto contra patógenos de plantas e do homem, uma vez que essa proteína, na concentração de 125 µg/mL, inibiu em 54% o crescimento de *C. albicans* no período de 36 horas de incubação, além de produzir efeitos tóxicos nas leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens* e *Candida parapsilosis*. SBTX foi capaz de inibir a acidificação do meio estimulada por glicose por *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo que seu mecanismo de ação antifúngica está relacionado com o bombeamento de prótons intracelulares para o meio externo. Ademais, essa toxina ainda ocasionou ruptura da parede celular, encolhimento do citosol, formação de pseudohifas e morte celular em *P. membranifaciens* e *C. parapsilosis* (MORAIS *et al.*, 2010). Estudos posteriores, com ênfase no mecanismo de ação de SBTX contra *C. albicans*, mostraram que a toxina promove uma reprogramação gênica nessas células, havendo indução de genes relacionados com o transporte de pequenas moléculas, estresse, além de genes ligados ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos, à respiração e ao ciclo celular (MORAIS *et al.*, 2013).

Apesar do conhecimento das propriedades inseticidas e antifúngicas da SBTX e das evidências de seu mecanismo de ação contra fungos, ainda são escassas informações referentes à sua distribuição tecidual durante o desenvolvimento da soja, comportamento de seus genes codificadores frente ao tratamento da planta com agentes abiótico e abiótico e localização nos cotilédones. Portanto, o presente trabalho foi conduzido com a premissa de fornecer novos dados sobre a distribuição e localização da SBTX em tecidos vegetais, bem como de avaliar o comportamento de seus genes codificadores frente ao tratamento de plantas de soja com ácido salicílico e *C. kikuchii*, um patógeno natural dessa leguminosa.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar os perfis de expressão dos transcritos de genes codificadores da SBTX durante o desenvolvimento da soja e frente ao tratamento da planta com elicitores abiótico e biótico, bem como obter informação sobre a localização tecidual dessa toxina nas sementes.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar a distribuição tecidual e expressão temporal de transcritos dos genes codificadores da SBTX durante os diferentes estágios (vegetativo e reprodutivo) de desenvolvimento da planta de soja;
- Avaliar os perfis de expressão dos genes codificadores da SBTX em resposta ao tratamento de folhas primárias de plantas de soja com ácido salicílico e *C. kikuchii*;
- Detectar a localização da SBTX em cotilédones de sementes maduras de soja.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Sementes

Sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill), cultivar BRS Pala (Safrá de 2009), foram doadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Trigo, Passo Fundo, RS, Brasil) ao Laboratório de Toxinas Vegetais (LabTox), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e armazenadas em frascos hermeticamente fechados a 18 °C.

### 4.2 Animais

A produção de anticorpos anti-SBTX foi realizada em coelhos albinos machos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), adquiridos do coelhário do Departamento de Zootecnia (UFC), com 8 a 12 semanas de idade. Os coelhos foram mantidos em gaiolas apropriadas e temperatura não superior a 25 °C. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991).

### 4.3 Fungo

O fungo *Cercospora kikuchii* foi obtido da micoteca mantida no Labtox, DBBM, UFC. O fungo foi mantido em meio de cultura Agar-tomate, em condições estéreis e apropriadas para o crescimento do microrganismo.

### 4.4 Reagentes e outros materiais

Os reagentes Tris (Ultra Pure Tris<sup>TM</sup>), acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, tetrametiletenodiamida (TEMED), persulfato de amônio, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS), IgG de cabra conjugada com peroxidase produzida contra IgG de coelho, “Coomassie Brilliant Blue” (G e R) 250, nitrato de prata, ditioneitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol e marcadores de massa molecular (*Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder*) foram obtidos de empresas como Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA) ou Invitrogen

(Carlsbad, EUA). As matrizes cromatográficas de DEAE-Celulose e CM-Sepharose foram obtidas da GE HeathCare (Uppsala, Suécia). *RNease Plant Mini Kit* e Dnase foram obtidos da Qiagen (Valencia, EUA). O kit de RT-PCR Improm-II, Go Taq DNA polimerase e tampão de reação GoTaq® foram obtidos da Promega (Wisconsin, EUA). SyBr Green foi obtido da Applied Biosystem (Waltham, EUA). Os demais reagentes usados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 5 METODOLOGIA

Para melhor entendimento do trabalho, a metodologia foi dividida em três etapas.

### ETAPA 1: DETECÇÃO DE TRANSCRITOS DE SBTX AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DA SOJA

#### 5.1 Condições de crescimento da soja

Para detecção de transcritos de SBTX ao longo do desenvolvimento da planta, foi realizado o plantio da soja em casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), temperatura de 25-28 °C e umidade atmosférica variável de 75 a 85%. Para isso, sementes de soja livres de danos mecânicos aparentes foram selecionadas e esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% durante 5 minutos, com o objetivo de eliminar possíveis patógenos presentes em seu tegumento. Posteriormente, as sementes foram embebidas em água destilada durante 2 horas e, então, lavadas em água corrente, procedida por água destilada. As sementes esterilizadas foram germinadas em areia autoclavada e as plântulas, obtidas após o período de sete dias, transferidas para um sistema de hidroponia em casa de vegetação, usando-se solução de Hoagland 50% (HOAGLAND; ARNON, 1950) e aeração constante. Após um período de sete dias de aclimação das plantas, passou-se a usar a solução de Hoagland 100%. Três plantas foram dispostas em bacias com capacidade de 10 L. Os tecidos (TABELA 4) foram coletados em triplicatas e macerados em nitrogênio líquido para posteriores extrações de RNA total.

#### 5.2 Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

##### 5.2.1 Extração de RNA total

Para obtenção do RNA total dos tecidos coletados, 100 mg do material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. O pó obtido da maceração foi submetido à extração do RNA total utilizando o *RNeasy plant mini kit*, de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 700 µL do tampão de lise RLT



Tabela 4 - Tecidos coletados e seus respectivos estádios de desenvolvimento

<b>Tecido</b>	<b>Idade da planta</b>	<b>Estádio de desenvolvimento</b>
Cotilédones	10 e 22 DAS	V <sub>2</sub> e V <sub>5</sub> , respectivamente
Folhas unifolioladas	10 e 22 DAS	V <sub>2</sub> e V <sub>5</sub> , respectivamente
Folhas trifolioladas	10, 22 e 45 DAS	V <sub>2</sub> , V <sub>5</sub> e R <sub>2</sub> , respectivamente
Raízes	10, 22 e 45 DAS	V <sub>2</sub> , V <sub>5</sub> e R <sub>2</sub> , respectivamente
Hipocótilos	10, 22 e 45 DAS	V <sub>2</sub> , V <sub>5</sub> e R <sub>2</sub> , respectivamente
Epicótilos	10, 22 e 45 DAS	V <sub>2</sub> , V <sub>5</sub> e R <sub>2</sub> , respectivamente
Flores	45 DAS	R <sub>2</sub> , respectivamente
Vagens	09 e 18 DAF	R <sub>2</sub> e R <sub>5.3</sub> , respectivamente
Sementes	15, 25 e 35 DAF e madura	R <sub>5.1</sub> , R <sub>5.3</sub> , R <sub>5.5</sub> e R <sub>2</sub> , respectivamente

Fonte: Elaborada pela autora.

DAS – Dias após a semeadura

DAF – Dias após a floração

V – Vegetativo

R - Reprodutivo

(fornecido pelo kit) e 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol às amostras maceradas, seguida de homogeneização com o auxílio de um agitador tipo vortex. O lisado foi transferido para uma coluna (*QIAshedder spin column – lilac*, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) do kit, que foi centrifugada a 23.000 x g, a 25 °C por 2 minutos (centrífuga Sorvall Biofuge pico, rotor F-4518-11, Eppendorf, Alemanha). O material foi recuperado e transferido para um novo tubo *eppendorf*, ao qual se adicionou metade do volume inicial de etanol 95%, tendo sido a solução obtida misturada por inversão e transferida para uma nova coluna do kit (*RNeasy mini spin column – pink*, acoplada a um tubo coletor de 2 mL). Essa coluna foi centrifugada a 12.000 x g, 25 °C, 15 segundos e o eluído descartado. Posteriormente, foram adicionados 350  $\mu$ L de tampão RW1 (fornecido pelo kit) à coluna *pink*, que foi submetida à centrifugação nas mesmas condições citadas acima. Com a finalidade de evitar a contaminação do material de interesse com DNA, 80  $\mu$ L de desoxirribonucleases (DNase) foram também aplicados na coluna que, por sua vez, foi deixada em repouso durante 15 minutos, a 25 °C. Transcorrido este tempo, 350  $\mu$ L de tampão RW1 foram novamente adicionados, procedendo-se com mais uma centrifugação nas mesmas condições. O eluído foi descartado e à coluna foram adicionados 500  $\mu$ L de RPE (fornecido pelo kit), submetendo-a a uma nova centrifugação a 12.000 x g, 25 °C, por 2 minutos, a fim de eliminar qualquer resíduo de etanol que pudesse interferir em reações posteriores. O material eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Na coluna, foram então adicionados 40  $\mu$ L de água livre de RNases que, mais uma vez, foi submetida à centrifugação a 12.000 x g, 25 °C, por 1 minuto para eluição do RNA. O RNA obtido foi armazenado a -80 °C para posterior quantificação, análises eletroforéticas, reações de transcrição reversa e ensaios de qRT-PCR.

### **5.2.2 Quantificação, pureza e integridade do RNA total**

Uma vez obtido o RNA total dos diferentes tecidos vegetais, a sua concentração e pureza foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos), a 260 nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), utilizando a razão de absorbância de 260/280 nm na identificação de contaminação por proteínas (razão satisfatória entre 1,8 a 2,0) e a razão absorbância 260/230 nm na avaliação de contaminação por polissacarídeos (razão aceitável acima de 2,0).

Para verificação da integridade do RNA foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,0% diluída em tampão MOPs (ácido 3-*N*-morfolinopropanosulfônico 0,2 M, acetato de

sódio 0,05 M, EDTA 0,01 M, pH 7,0) a fim de se identificar as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais (18S e 28S). Foi aplicado no gel o equivalente a 1 µg das amostras de RNA e a corrida foi conduzida numa amperagem constante de 50 mA, durante 30 minutos (Power PAC 300, Bio Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido). Após corrida eletroforética, o gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), por 15 minutos, tendo sido as bandas visualizadas após sua exposição a raios ultravioletas em um transiluminador (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido). O resultado foi armazenado usando o fotodocumentador *Bio-Imaging Systems MiniBis Pro transluminador* (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido).

### **5.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

A primeira fita de cDNA a partir do RNA total das amostras foi obtida pela reação da enzima transcriptase reversa, conforme as recomendações contidas no Kit Improm II (Promega). Foi utilizado 1 µg de RNA total em todas as reações de amplificação do cDNA juntamente ao tampão de reação da transcriptase reversa 5x, dNTPs (10 mM), oligo dT (2 pmols/µL) e transcriptase reversa (0,2 U/µL), finalizando uma mistura reacional de 20 µL (TABELA 5). A reação foi conduzida a 42 °C por 1 hora e, em seguida, a transcriptase reversa foi inativada a 75 °C, por 15 minutos. Os produtos da reação foram armazenados a -20 °C, para análises posteriores.

### **5.2.4 PCR semi-quantitativa**

A PCR semi-quantitativa foi realizada para analisar a qualidade do cDNA obtido. Assim, foram utilizados iniciadores do gene do fator de alongação *Efla2a*, um gene constitutivo. A reação consistiu em 1 µL de cDNA, tampão de reação 5x, dNTPs (5 mM), iniciador específico do gene e na enzima Go Taq DNA polimerase, totalizando um volume final de 25 µL (TABELA 06). A análise do resultado da amplificação foi feita em gel de agarose 2%.

Tabela 5 - Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa

Reagentes	Volume ou quantidade
RNA total	1,0 µg
Tampão 5x	4,0 µL
Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> ) (25 mM)	2,4 µL
dNTPs (10 mM)	1,0 µL
Oligo(dT)15 (20 pmols/µL)	1,0 µL
Água livre de RNases	Volume variável
Transcriptase reversa (160 U/µL)	1,0 µL
Volume final	20,0 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 - Componentes e volumes usados nas reações para validação do cDNA

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
cDNA	1,0
Tampão 5x	5,0
Água livre de RNase	15,9
dNTPs (5 mM)	1,0
Iniciador 5'	1,0
Iniciador 3'	1,0
Go Taq polimerase	0,1
Volume final	25,0

Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.2.5 Desenho dos iniciadores (primers) para qRT-PCR

A partir de informações das sequências NH<sub>2</sub>-terminal da SBTX (VASCONCELOS *et al.*, 2008), de bancos de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) e de sequências encontradas no genoma da soja, os iniciadores das subunidades de 27 kDa e 17 kDa foram desenhados. Na obtenção final das sequências dos iniciadores, as ferramentas de bioinformática *Perl Primer* (MARSHALL, 2004), *OligoTech*, *ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment* e *EXPASy* foram utilizadas. No desenho dos iniciadores foram utilizados os seguintes fatores como critérios: temperaturas de anelamento semelhantes; exclusão da presença de pseudogenes e reconhecimento de apenas um gene, ou seja, alta especificidade. Para isto, alguns cuidados foram tomados, incluindo a seleção de regiões ricas em aminoácidos que apresentassem apenas um códon no mRNA (cDNA), tamanho adequado em torno de 21 a 24 nucleotídeos, englobando uma região correspondente a 7 ou 8 aminoácidos e, também, ausência de degenerações na extremidade 3', apresentando os nucleotídeos guanina e citosina. A Tabela 07 mostra as sequências desenhadas para os genes *SBTX17* e *SBTX27*, que codificam as subunidades de 17 e 27 kDa, respectivamente.

Uma vez definidas as sequências dos iniciadores, a confecção deles foi feita pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, EUA). Uma solução de 20 µM dos iniciadores foi preparada como estoque, a partir da qual foram realizadas diluições encerrando uma concentração final de 6 µM, confirmada por espectrofotometria em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Com o objetivo de normalizar os dados de expressão gênica, foram considerados também os genes descritos nas Tabelas 8 e 9.

### 5.2.6 PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de amplificação por PCR quantitativa foram realizadas a partir do cDNA, obtido das reações de transcrição reversa das amostras de RNA e diluído para uma concentração de 25 ng/µL. Na qRT-PCR, para cada reação foram adicionados 10 µL do *Power SYBR Green PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems), 4 µL de cDNA (100 ng), 1 µL de oligonucleotídeo iniciador (senso e anti-senso) na concentração de 300 ng/µL e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e livre de nucleases, totalizando 20 µL de reação. O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador Mastercycler ep

realplex 4S (Eppendorf®, Nova Iorque, Estados Unidos), através da detecção dos níveis de fluorescência.

Tabela 7 - Sequência de iniciadores dos genes da SBTX

Gene	Produto gênico	Sequência do iniciador (5'-3')*	Temperatura de anelamento (°C)
<i>SBTX17</i>	Subunidade de 17 kDa da SBTX	Fwd5'ACCGGCGAGAAGGGCGTA3' Rev5'TCGCCACCCTGACACATGAAA3'	55
<i>SBTX27</i>	Subunidade de 27 kDa da SBTX	Fwd5'ACTGAGATTCGTATCGCTGG 3' Rev5'GGTTGTGGCAGAAGTTACTC 3'	55

Fonte: Elaborada pela autora.

\*Iniciadores foram desenhados com bases nas sequências NH<sub>2</sub>-terminal das duas subunidades da SBTX (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Fwd (*Forward*): Senso; Rev (*Reverse*): Anti-senso.

Tabela 8 - Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT-PCR de tecidos vegetativos, flores e vagens

Gene	Produto gênico	Sequencia do iniciador (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>SKIP 16</i> *	SKIP16/ Proteína de interação 16	Fwd 5'CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG 3' Rev 5'AAGGACAGAAGACTTGCCACTC 3'	50,7	60
<i>MTP</i> *	Metaloprotease, enzima de degradação da insulina	Fwd 5'CGCTCCAAGTGCTCCTCATTAG 3' Rev 5'TGAAGTAACCGACGCCAACG 3'	63,6	71
<i>UKN1</i> *	Proteína hipotética	Fwd 5'TGGTGCTGCCGCTATTTACTG 3' Rev 5'GGTGAAGGAAGTCTAACAATC 3'	63,6	74
<i>EF1β</i> *	Fator de elongação 1β	Fwd 5'CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG 3' Rev 5'AAGGACAGAAGACTTGCCACTC 3'	63,6	134
<i>EF1α2b</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'TTTCTGTACTCTTGTGTCTTCT 3' Rev 5'ACAAACACAACACATTAAAACAC 3'	57,5	159
<i>EF1α3</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GTGCTGGATGGTTTATCAAGG 3' Rev 5'AAAGTTGCGAGATGACGGAG 3'	63,6	140
<i>EF1α2a</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GGATGTCGTTTCTTATGGT 3' Rev 5'CAAACACAACACATTAAAACAG 3'	57,5	189
<i>EF1α1b</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'ATCATCGTGGTTACTCCTTTAT 3' Rev 5'TCAGACTCTTCTTACCATCA 3'	59,8	199
<i>EF1α1a1</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GATTTTCATGTAGCCGTAGCC 3' Rev 5'ATTTAAGACATCCCTCCTCAG 3'	59,8	182
<i>EF1α1a2</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'ATCATCGTGGTTACTCCTTTAT 3' Rev 5'TCAGACTCTTCTTACCATCA 3'	59,8	199

Fonte: Elaborada pela autora.

\*Hu, *et al.* (2009); #Saraiva *et al.* (2014). Fwd (*Forward*): Senso; Rev (*Reverse*): Anti-senso.



Tabela 9 - Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT-PCR de sementes em desenvolvimento

Gene	Produto gênico	Sequência do iniciador(5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>SKIP 16</i> *	SKIP16/Proteína de interação 16	Fwd 5'CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG 3' Rev 5'AAGGACAGAAGACTTGCCACTC 3'	50,7	60
<i>MTP</i> *	Metaloprotease, enzima de degradação da insulina	Fwd 5'CGCTCCAAGTGCTCCTCATTAG 3' Rev 5'TGAAGTAACCGACGCCAACG 3'	63,6	71
<i>UKNI</i> *	Proteína hipotética	Fwd 5'TGGTGCTGCCGCTATTTACTG 3' Rev 5'GGTGGAAGGAACTGCTAACAATC 3'	63,6	74
<i>EF1β</i> *	Fator de elongação 1β	Fwd 5'CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG 3' Rev 5'AAGGACAGAAGACTTGCCACTC 3'	63,6	134
<i>EF1α17</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'TTTCTGTACTCTTGTGTCTTCT 3' Rev 5'ACAAACACAACACATTAACAC 3'	57,5	159
<i>EF1α5a</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GATTTCATGTAGCCGTAGCC 3' Rev 5'ATTTAAGACATCCCTCCTCAG 3'	59,8	182
<i>EF1α5b</i> #	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GGATGTCGTTTCTTATGGT 3' Rev 5'CAAACACAACACATTAACACAG 3'	57,5	189
<i>UKN2</i> *	Proteína hipotética	Fwd 5'GCCTCTGGATACCTGCTCAAG 3' Rev 5'ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG 3'	62,7	79
<i>ACT2/7</i> *	Actina	Fwd 5'AATTCACGAGACCACCTACAAC 3' Rev 5'TGAGCCACCACTAAGAACAATG 3'	61,7	91
<i>UBQ10</i> *	Ubiquitina	Fwd 5'TCCCACCAGACCAGCAGAG 3' Rev 5'CACGAAGACGCAACACAAGG 3'	62,7	117
<i>TUB4</i> *	Tubulina B4	Fwd 5'GGCGTCCACATTCATTGGA 3' Rev 5'CCGGTGTACCAATGCAAGAA 3'	55,3	111
<i>TUA5</i> *	Tubulina	Fwd 5'TGCCACCATCAAGACTAAGAGG 3' Rev 5'ACCACCAGGAACAACAGAAGG 3'	60,9	103

Fonte: Elaborada pela autora.

\*Hu *et al.* (2009); #Saraiva *et al.* (2014). Fwd (*Forward*): Senso; Rev (*Reverse*): Anti-senso.

do *SYBR Green*. As análises dos dados de fluorescência foram realizadas pelo *Realplex Software*. As reações ocorreram em placas com 96 poços, em triplicata e conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos de anelamento, variando a temperatura de acordo com cada par de iniciador (TABELAS 07, 08 e 09) e 20 segundos de extensão a 60 °C. Também foi realizada a curva de dissociação (Melting), consistindo de 15 segundos de incubação a 95 °C, 15 segundos de incubação a 60 °C e uma subida de 95 °C. Os *Cycle threshold* (Ct) utilizados para as análises foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas de reações para cada condição e gene. Para normalização dos resultados, foi utilizada a equação  $\Delta Ct = Ct \text{ (gene alvo)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$ . A calibração foi determinada pela fórmula:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (controle)}$ . Já a quantificação relativa foi obtida pelo método  $E^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde E é a eficiência de cada par de iniciador. Para tanto, uma curva de eficiência foi construída para cada par de iniciador, a partir de um *pool* de todos os cDNA estudados, considerando 4 diluições em base 10 desses cDNAs. Para o cálculo da eficiência, as fórmulas,  $slope = C_{11} - C_{14}/4-0$  e  $E = 10^{(-1/-slope)} - 1$  foram utilizadas, considerando o resultado  $E = 1$  como 100% de eficiência dos iniciadores.

## ETAPA 2: DETECÇÃO DE TRANSCRITOS DE SBTX EM FOLHAS DE SOJA TRATADAS COM ELICITORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

### 5.3 - Plantio em casa de vegetação

Para detecção de transcritos de SBTX em folhas submetidas a diferentes estresses, plantou-se soja de acordo com o que está descrito no item 5.1, com adequações. O plantio foi feito na casa de vegetação do Laboratório de Metabolismo e Estresse de Plantas da UFC, onde as plantas cresceram até os 32 dias após a semeadura. Após esse tempo, elas foram transferidas para uma sala com parâmetros controlados, tendo uma temperatura média de 25 °C, umidade atmosférica variando entre 70 e 80% e fotoperíodo de 12 horas, utilizando luminosidade artificial. Após três dias de aclimação, quando as plantas atingiram o estágio V5, as folhas primárias foram submetidas a diferentes tratamentos. A escolha desse estágio se deu devido ao fato de que o fungo *C. kikuchii* geralmente infecta folhas de soja no final de seu desenvolvimento vegetativo. Este fungo foi selecionado por ter se mostrado suscetível à SBTX, conforme testes *in vitro* (MORAIS, 2010).

### 5.4 Obtenção da suspensão de conídios do fungo *C. kikuchii*

Para obtenção da suspensão de conídios a serem utilizados como elicitor biótico, o fungo *C. kikuchii* foi repicado em placa de Petri contendo 20 mL do meio ágar-tomate (200 mL de suco de tomate puro, 3 g de cloreto de cálcio, 5 g de dextrose, 20 g de ágar-ágar, água q.s.p. 1000 mL). A suspensão de conídios foi preparada quando o crescimento micelial ocupou completamente as placas, após um período de 15 dias. Para tanto, as placas foram abertas em capela de fluxo laminar, adicionadas de 10 mL de água estéril e os conídios removidos com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. O material obtido foi filtrado em malha de nylon para eliminação de fragmentos de hifas e recebeu a denominação de suspensão padrão. Posteriormente, foi feita a contagem dos conídios em câmara de Neubauer, seguida de diluição a fim de ser obtido um inóculo com concentração de  $2,0 \times 10^5$  conídios/mL (MORAIS, 2010).

## 5.5 Tratamentos das plantas de soja com elicitores abiótico e biótico

Os tratamentos foram realizados nas folhas primárias, no 35° dia após o plantio. No tratamento abiótico, foi usado ácido salicílico 5 mM, preparado em água, o qual foi depositado em 4 gotas (25 µL, cada) na superfície adaxial da folha, duas de cada lado da nervura central. Para o grupo controle, aplicou-se apenas água destilada. Para o tratamento com elicitor biótico, as plantas foram inoculadas com conídios do fungo *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL). Para possibilitar o acesso do fungo, as folhas primárias foram previamente injuriadas mecanicamente com auxílio de agulha estéril. Duas injúrias, de cada lado da nervura central, foram feitas, seguidas de aplicação de 4 gotas da suspensão de conídios, uma gota para cada injúria. Para os grupos controles, aplicou-se apenas água destilada e paralelamente fez-se outro tratamento injuriando as folhas e aplicando água destilada logo em seguida. Os dados obtidos para o tratamento com o fungo foram subtraídos com os dados obtidos no tratamento das plantas com injúria e água destilada. Cada tratamento foi realizado em três repetições, sendo cada repetição constituída por 3 plantas.

As folhas tratadas foram excisadas das plantas nos tempos de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas após aplicação dos tratamentos. Imediatamente após a coleta, as folhas foram pesadas, embaladas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para análises posteriores.

## 5.6 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

### 5.6.1 Obtenção do RNA total

Para obtenção do RNA total, 100 mg de folhas primárias material foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. O restante do procedimento foi similar ao descrito no item 5.2.1. Para quantificação, avaliação pureza e integridade do RNA extraído, seguiu-se o mesmo protocolo apresentado no item 5.2.2.

### 5.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Na obtenção cDNA, a partir do RNA total das diferentes amostras-teste, seguiu-se as mesmas metodologia descritas nos itens 5.2.3 e 5.2.4.

### **5.6.3 Desenho dos iniciadores para qRT-PCR**

Os iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real foram desenhados de acordo com o item 5.2.5. Com o objetivo de normalizar os dados de expressão gênica, foram considerados os genes descritos nas Tabelas 10 e 11.

### **5.6.4 qRT-PCR**

A detecção de transcritos de SBTX em folhas primárias submetidas aos diferentes tratamentos ocorreu por qRT-PCR. As análises foram realizadas a partir dos respectivos cDNA e as temperaturas de anelamento variaram em cada reação conforme o iniciador utilizado (TABELAS 10 e 11). Ao fim de cada reação foi realizada a curva de dissociação (*melting curve*) para verificar se apenas um amplicon era gerado em cada reação. O gene da proteína relacionada à patogênese PR3 foi usado como controle positivo.

Tabela 10 - Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT-PCR de folhas tratadas com ácido salicílico 5 mM

Gene	Produto gênico	Sequência do iniciador (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>SKIP 16</i> <sup>*</sup>	SKIP16/Proteína de interação 16	Fwd 5'CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG3' Rev 5'AAGGACAGAAGACTTGCCACTC3'	50,7	60
<i>ACT</i> <sup>**</sup>	Proteína estrutural do citoesqueleto	Fwd 5'GAGCTATGAATTGCCTGATGG3' Rev 5'CGTTTCATGAATTCCAGTAGC3'	55,0	118
<i>UKNI</i> <sup>*</sup>	Proteína hipotética	Fwd 5'TGGTGCTGCCGCTATTTACTG3' Rev 5'GGTGAAGGAAGGCTAACAATC3'	63,6	74
<i>EF1α2b</i> <sup>#</sup>	Fator de elongação 1α	Fwd 5'TTTCTGTACTCTTGTGTCTTCT3' Rev 5'ACAAACACAACACATTAAAACAC3'	57,5	159
<i>EF1α2a</i> <sup>#</sup>	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GGATGTCGTTTCTTATGGT3' Rev 5'CAAACACAACACATTAAAACAG3'	57,5	189
<i>EF1α1a</i> <sup>#</sup>	Fator de elongação 1α	Fwd 5'GATTTTCATGTAGCCGTAGCC3' Rev 5'ATTTAAGACATCCCTCCTCAG3'	59,8	182

Fonte: Elaborada pela autora.

\* Hu *et al.* (2009); \*\* Morais (2012); #Saraiva *et al.* (2014). Fwd (*Forward*): Senso; Rev (*Reverse*): Anti-senso.

Tabela 11 - Genes normalizadores utilizados nas análises de expressão por RT-PCR de folhas tratadas com o fungo *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  esporos/mL)

Gene	Produto gênico	Sequência do iniciador (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>EF1<math>\beta</math></i> *	Fator de elongação 1 $\beta$	Fwd 5'CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG3' Rev 5'AAGGACAGAAGACTTGCCACTC3'	63,6	134
<i>EF1<math>\alpha</math>2b</i> #	Fator de elongação 1 $\alpha$	Fwd 5'TTTCTGTACTCTTGTGTCTTCT3' Rev 5'ACAAACACAACACATTAAAACAC3'	57,5	159
<i>EF1<math>\alpha</math>2a</i> *	Fator de elongação 1 $\alpha$	Fwd 5'GGATGTCGTTTCTTATGGT3' Rev 5'CAAACACAACACATTAAAACAG3'	57,5	189
<i>ACT</i> **	Proteína estrutural do citoesqueleto	Fwd 5'GAGCTATGAATTGCCTGATGG3' Rev 5'CGTTTCATGAATTCCAGTAGC3'	55	118
<i>EF1<math>\alpha</math>1<math>\alpha</math>1</i> *	Fator de elongação 1 $\alpha$	Fwd 5'GATTTTCATGTAGCCGTAGCC3' Rev 5'ATTTAAGACATCCCTCCTCAG3'	59,8	182
<i>ACT11</i> **	Proteína estrutural do citoesqueleto	Fwd 5'ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC3' Rev 5'GCTGGTCCTGGC TGTCTCC3'	83,3	126

Fonte: Elaborada pela autora.

\* Hu *et al.* (2009); \*\* Moraes (2012); #Saraiva *et al.* (2014). Fwd (*Forward*): Senso; Rev (*Reverse*): Anti-senso.

### **ETAPA 3: IMUNOLOCALIZAÇÃO DA SBTX EM SEMENTES MADURAS DE SOJA**

#### **5.7 Purificação de SBTX**

##### ***5.7.1 Preparação da farinha de soja***

Sementes quiescentes do genótipo BRS-Pala foram trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho elétrico para café. A farinha obtida foi delipidada em éter de petróleo, na proporção de 1:10 (m/v), sob exaustão em capela, à temperatura ambiente (25 °C). O solvente foi trocado diversas vezes até a completa remoção dos lipídios. Após delipidação, a farinha foi deixada sobre papel filtro à temperatura ambiente até a evaporação total do solvente e, posteriormente, acondicionada em frasco hermeticamente fechado e conservada a 4 °C.

##### ***5.7.2 Extração e purificação da SBTX***

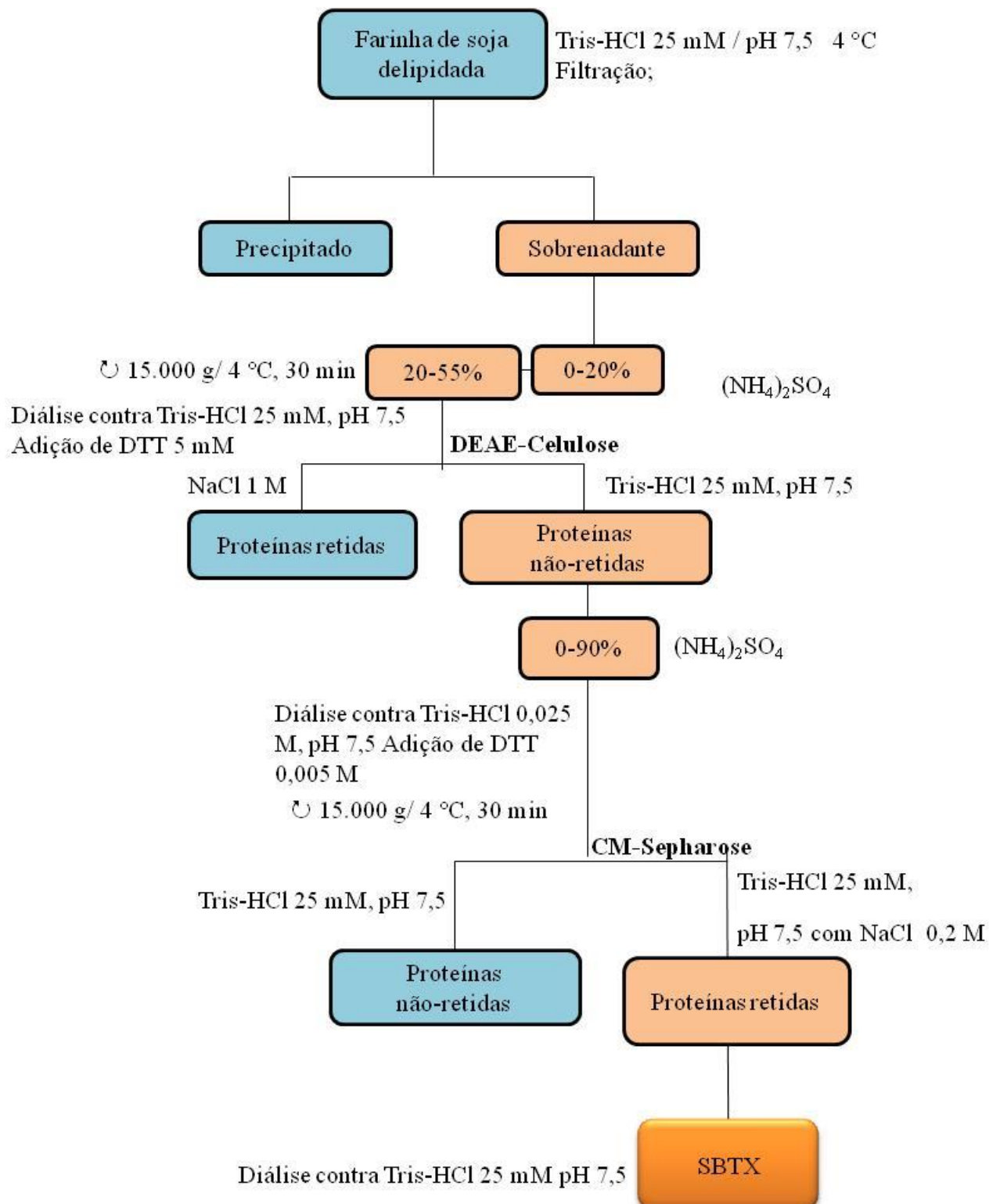
A purificação da SBTX foi necessária para a produção de anticorpos anti-SBTX utilizados nos ensaios de imunolocalização dessa proteína em sementes maduras de soja. As etapas de purificação foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Vasconcelos *et al.* (2008). A pureza da proteína foi avaliada por PAGE-SDS (LAEMMLI, 1970), conforme descrição adiante. O processo de purificação da SBTX está resumido na Figura 6.

##### ***5.7.3 Determinação de proteínas***

A determinação de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando BSA, em várias concentrações, como padrão. A uma alíquota de 100 µL das amostras proteicas foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford (50 mL de metanol 95%, 100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250, 100 mL de ácido fosfórico 85% e 900 mL de água destilada). A mistura foi agitada e após 10 min foram feitas às leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Novapesc II, Pharmacia). A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com BSA.



Figura 6 - Esquema de purificação da SBTX



Fonte: Elaborada pela autora.

#### **5.7.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)**

Com o objetivo de avaliar a pureza da proteína obtida, SBTX foi analisada em condição desnaturante (PAGE-SDS), utilizando o método de eletroforese descontínua descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. Um gel de poliacrilamida de 1 mm de espessura, composto por um gel de aplicação que encerrava 3,5% de acrilamida (preparado em tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8 e 1% de SDS) e um gel de separação que encerrava 17,5% de acrilamida (preparado em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,8, contendo 0,2 M de glicina e 1% de SDS), foi montado num sistema de eletroforese vertical.

Amostras de SBTX (2 mg/mL) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na ausência e presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 5,0%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 15 minutos, e centrifugadas a 10.000 x g, 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. Aliquotas encerrando 20  $\mu$ L das amostras de SBTX foram aplicadas no gel, o qual foi submetido a uma corrente de 20 mA, durante 1 h. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical (HOEFER SE 250, GE Healthcare, Pittsburgh, EUA). Como marcadores de massa molecular foram usados: albumina sérica bovina (67 kDa), albumina do ovo (45 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica bovina (29 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa). As bandas proteicas foram visualizadas por revelação com prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

#### **5.7.5 Produção de anticorpos anti-SBTX**

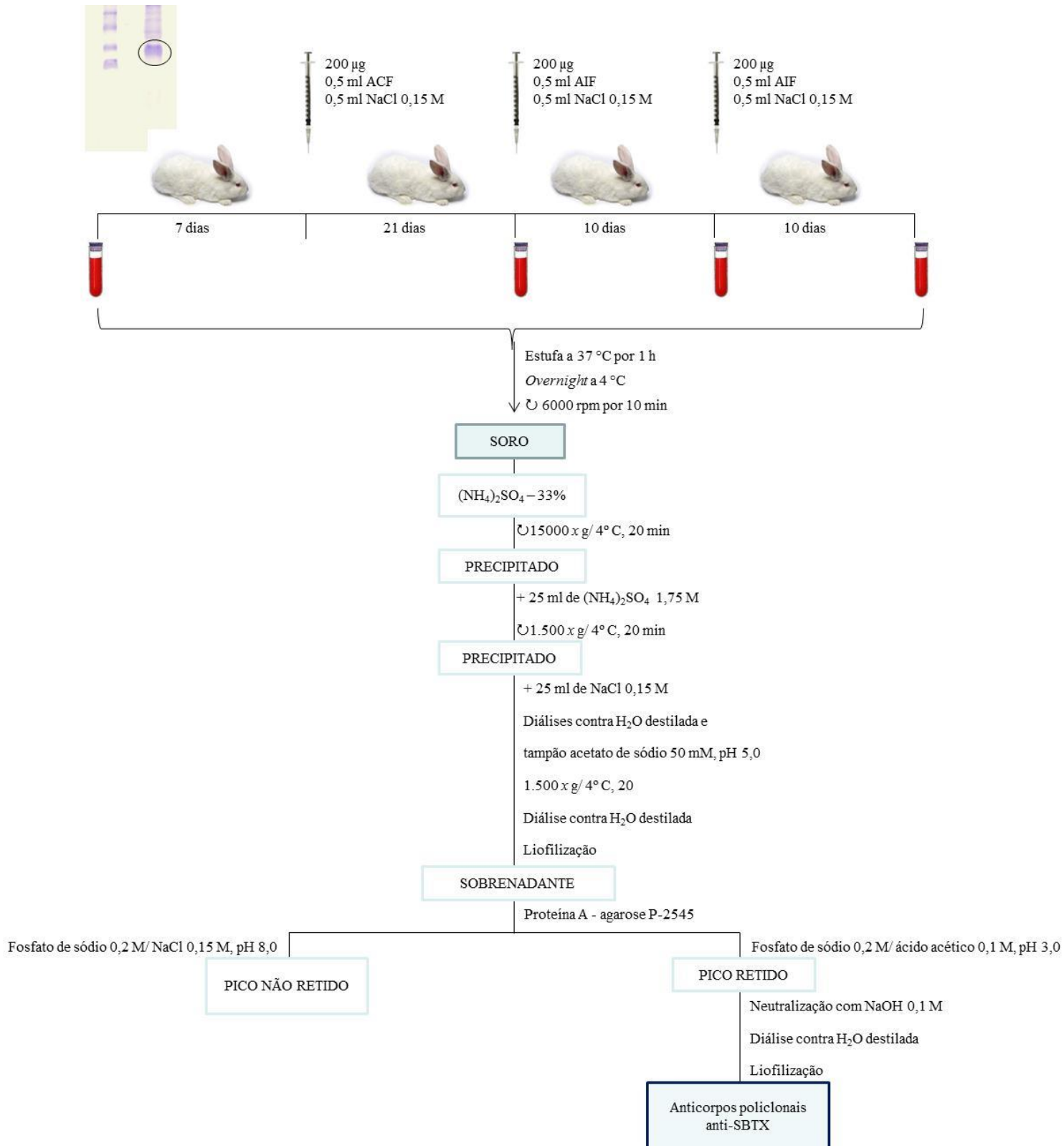
Anticorpos anti-SBTX foram produzidos em coelho da espécie *O. cuniculus* (raça Nova Zelândia), com idade de 4 meses. O animal foi aclimatado em biotério por duas semanas antes do início do procedimento. A produção de anticorpos foi embasada no trabalho de Rios e colaboradores (1996).

Previamente ao processo de imunização, foi coletada uma amostra de sangue dos animais para obtenção do soro pré-imune. Em seguida, os animais foram imunizados com uma emulsão contendo 0,2 mg de SBTX, 0,5 mL de NaCl 0,15 M e 0,5 mL de adjuvante

completo de Freund pela via subcutânea. Vinte e um dias após a primeira inoculação, uma nova aplicação de proteína (0,2 mg) foi realizada pela via subcutânea, utilizando como veículo 0,5 mL de NaCl 0,5 M e 0,5 mL de adjuvante incompleto de Freund. Decorridos sete dias, foram iniciadas as coletas de sangue para obtenção do soro imune, que foram associadas com imunizações encerrando 0,2 mg de SBTX. As demais coletas e imunizações foram realizadas em intervalos de 7 a 10 dias, usando a emulsão de SBTX em adjuvante incompleto de Freund. O antissoro obtido em cada coleta foi precipitado com sulfato de amônio sólido a 33% de saturação e, em seguida, dialisado em trocas alternadas com água bidestilada e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, a cada 12 horas, durante seis dias. O dialisado foi centrifugado (1.500 x g, 20 minutos, 4 °C) e o sobrenadante submetido à cromatografia em matriz de Proteína A-agarose P-2545, equilibrada previamente com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M. A eluição do material não retido foi realizada com tampão de equilíbrio, ao passo que o material retido (rico em IgG policlonal anti-SBTX) foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 3,0, contendo ácido acético 0,1 M. A cromatografia foi conduzida em um fluxo de 1,2 mL/minuto, coletando-se frações de 3 mL. O pico retido foi, então, dialisado contra água grau Milli-Q, concentrado através de liofilização e armazenado a 20 °C (FIGURA 7).

O título dos anticorpos foi estimado através da metodologia de *Dot Blot*, descrita por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Para isso, 10 µL de SBTX (1 mg/mL em Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5) foram aplicados sobre membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) até sua completa absorção. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em tampão TBS (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%) acrescido de leite em pó desnatado 5%. Subsequentemente, a membrana foi imersa em solução de anticorpo primário anti-SBTX em TBS nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:500 e mantida por 2 horas a 37 °C. Após essa etapa, a membrana foi lavada por, pelo menos, cinco vezes com TBS e, então, incubada em presença do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluição 1:1000 em TBS), a 37° C, por 1 hora. A membrana foi novamente lavada com o mesmo tampão e, por fim, submetida ao processo de revelação com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 1 mg/mL) em e peróxido de hidrogênio 3%.

Figura 7 - Esquema de obtenção de anticorpos anti-SBTX



Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.7.6 Imunohistoquímica

A imunolocalização da SBTX foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, baseada no trabalho de Páez-Valencia *et al.* (2008), com modificações. Sementes maduras de soja foram fixadas em solução de Karnovsky [paraformaldeído 1% (m/v), glutaraldeído 3% (v/v) e tampão cacodilato de sódio 0,07 M, pH 7,2], a 4 °C, durante aproximadamente 12 horas. As sementes foram lavadas com tampão TBS, três vezes, cada lavagem encerrando 30 minutos. Após as lavagens, cortes das sementes foram realizados à mão livre, usando lâminas de aço, que foram imersos em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 4,0 e aquecidos a 90 °C. Os cortes foram lavados com TBS, duas vezes, 5 minutos cada lavagem e, posteriormente, com esse mesmo tampão contendo 3% de leite desnatado, por 2 horas. Transcorrido esse tempo, os cortes foram lavados com TBS, duas vezes, 5 minutos cada e, então, incubados com o soro pré-imune (branco) ou com anticorpos anti-SBTX na diluição de 1:50, 4 °C, durante 12 horas. Após incubação, os cortes foram novamente lavados com TBS, duas lavagens, 5 minutos cada e postos em contato com peróxido de hidrogênio 30%, a 25 °C, por 10 minutos. Os cortes foram submetidos a uma lavagem rápida com água destilada para remoção do excesso de peróxido de hidrogênio, procedida por mais duas lavagens com TBS, 5 minutos cada. Logo após, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário acoplado à peroxidase (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) (1:2000 em TBS), a 37 °C, por 2 horas e, em seguida, lavados com TBS, duas vezes, 5 minutos cada. Os cortes foram submetidos ao processo de revelação, o qual consistiu na sua incubação com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 1 mg/mL) em TBS contendo imidazol (1 mg/mL) e peróxido de hidrogênio 3%, a 25 °C, por 40 minutos. Feito isso, os cortes foram lavados em água destilada, corados com hematoxilina de Harris, por 5 minutos, e novamente lavados com água destilada para remoção do excesso do corante. Os cortes foram montados em lâminas e lamínulas usando glicerol 90% e visualizados em microscópio óptico.

## 6 RESULTADOS

### ETAPA 1: NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE SBTX AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DA SOJA

#### 6.1 Propriedades do RNA extraído dos tecidos vegetais

Os tecidos coletados (TABELA 12) apresentaram características morfológicas condizentes com um desenvolvimento de planta normal e saudável (FIGURA 8), apresentando um ciclo reprodutivo de 133 dias e dando início à produção de flores e sementes após 45 dias da semeadura. A partir de cada tecido coletado, foi feito um macerado do qual se extraiu seu RNA total. A Tabela 12 mostra os valores médios das concentrações de RNA dos tecidos e as relações de absorvâncias a fim de verificar possíveis contaminações com proteínas e carboidratos. As concentrações de RNA total extraído das diferentes amostras variaram de 136,90 a 1624,20 ng/ $\mu$ L. A maioria das amostras de RNA apresentou relações de absorvância A260/280 e A260/230 próximas a 2, indicando uma alta qualidade do RNA extraído. Além disso, os perfis observados no gel de agarose demonstraram bandas bem definidas referentes aos RNA ribossomais 18S e 28S, comprovando a integridade do material extraído (FIGURA 9).

#### 6.2 Qualidade do cDNA sintetizado

A integridade do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído dos tecidos vegetais foi verificada através da visualização da banda referente ao amplicon do gene do fator de alongação *Efla2a* (189 pb) em gel de agarose (FIGURA 10). Esse amplicon foi resultante de reação de PCR semiquantitativa.

#### 6.3 - Padronização dos genes de referência para qRT-PCR

Para normalização dos resultados de qRT-PCR, os genes da soja *MTP* (metaloprotease), *SKIP16* (proteína de interação 16) e *UKNI* (proteína hipotética) foram escolhidos tanto para os tecidos vegetativos, como para as vagens e flores. Para as amostras obtidas de sementes em diferentes fases de desenvolvimento, os genes da soja utilizados para normalização dos dados

Tabela 12 - Valores médios das concentrações e relações de absorvâncias do RNA total extraído dos diferentes tecidos de soja, coletados ao longo de seu desenvolvimento

<b>Tecido</b>	<b>Concentração média (ng/μL)</b>	<b>Relação 260/280</b>	<b>Relação 260/230</b>
Cotilédones 10 DAS	841,10	2,14	2,31
Cotilédones 22 DAS	136,90	2,11	1,52
Folha unifoliolada 10 DAS	591,95	2,10	1,80
Folha unifoliolada 22 DAS	370,20	2,14	2,06
Folha trifoliolada 10 DAS	783,65	2,10	2,30
Folha trifoliolada 22 DAS	545,00	2,09	2,26
Folhas trifoliolada 45 DAS	246,50	2,13	2,13
Raiz 10 DAS	788,40	2,12	1,88
Raiz 22 DAS	529,60	2,11	1,54
Raiz 45 DAS	330,70	2,12	1,45
Hipocótilo 10 DAS	260,50	2,11	1,90
Hipocótilo 22 DAS	159,90	2,14	1,74
Hipocótilo 45 DAS	409,40	2,13	1,96
Epicótilo 10 DAS	817,70	2,13	1,43
Epicótilo 22 DAS	382,30	2,13	1,00
Epicótilo 45 DAS	578,30	2,11	1,78
Flores 45 DAS	420,40	2,11	1,53
Vagens 9 DAF	1149,70	2,15	2,04
Vagens 18 DAF	758,00	2,12	2,21
Sementes 15 DAF	1219,40	2,10	2,24
Sementes 25 DAF	1624,20	2,12	1,99
Sementes 35 DAF	777,10	2,11	2,22
Sementes maduras	1457,69	2,07	1,98

Fonte: Elaborada pela autora.

DAS – Dias após a semeadura

DAF – Dias após a floração

V – Vegetativo

R – Reprodutivo

Figura 8 - Plantio de soja em casa de vegetação

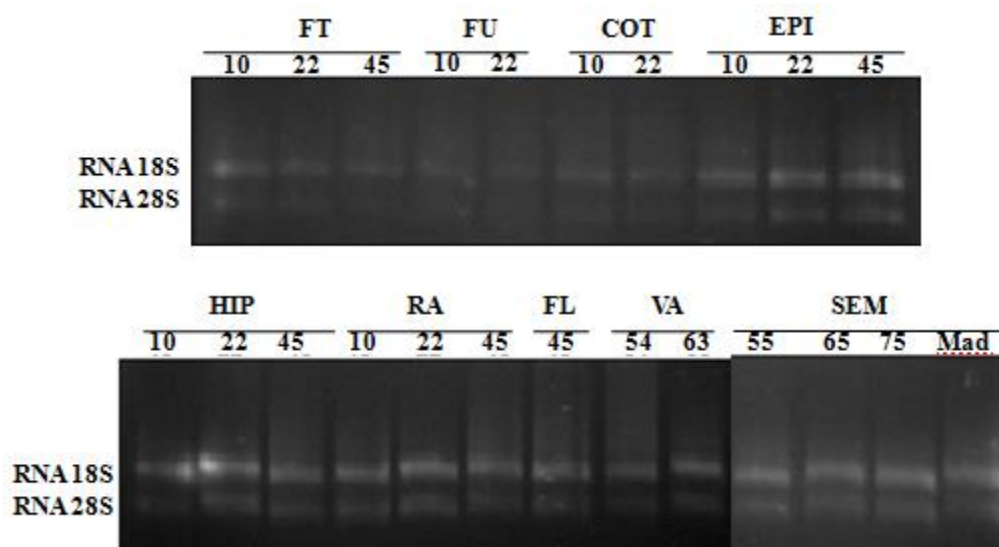


Fonte: Elaborada pela autora.

(A): Plantas de soja no estágio VC (estádio de cotilédone); (B) Plantas de soja em estágio V4 (estádio vegetativo apresentando o quarto nó formado).



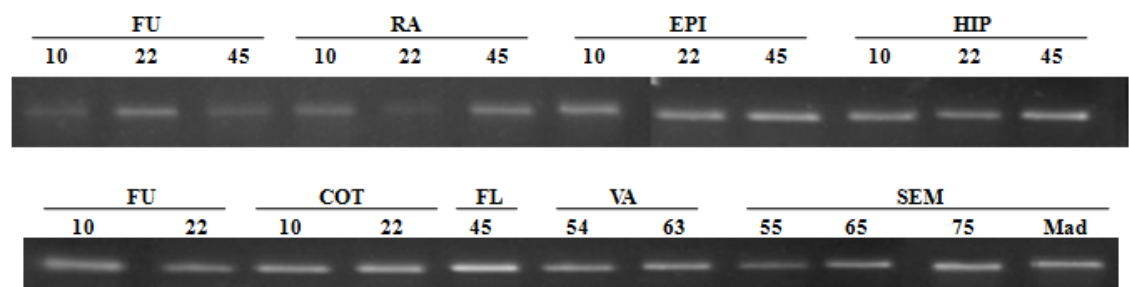
Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) do RNA extraído dos tecidos vegetais de soja



Fonte: Elaborada pela autora.

A integridade das amostras é evidenciada pelo aparecimento de duas bandas (18S e 28S) bem definidas referentes ao RNA ribossomal. Os RNA totais foram extraídos dos seguintes tecidos: folhas trifolioladas (FT), folhas unifolioladas (FU), cotilédones (COT), epicótilos (EPI), hipocótilos (HIP), raízes (RA), flores (FL), vagens (VA) e sementes (SEM). Os números indicados acima de cada raia indicam o número de dias decorridos após a semeadura e Mad se refere à semente madura.

Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene do fator de alongação *Efla2a*



Fonte: Elaborada pela autora.

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA extraído dos seguintes tecidos: folhas trifolioladas (FT), folhas unifolioladas (FU), cotilédones (COT), epicótilos (EPI), hipocótilos (HIP), raízes (RA), flores (FL), vagens (VA) e sementes (SEM). Os números indicados acima de cada raia indicam o número de dias decorridos após a semeadura e Mad se refere à semente madura.

foram *MTP* e fator de elongação *EFla5a*. A utilização desses genes foi baseada nos trabalhos Hu *et al.* (2009) e Saraiva *et al.* (2014) e, também, nos gráficos gerados pelo programa geNorm, visto que ele permite calcular o número mínimo de genes a serem utilizados como referência para normalização de dados de expressão gênica, o qual usa como parâmetro o valor “V”, sendo sugerida a utilização de 0,15 como valor de exclusão para cada par de genes. As Figuras 11 e 12 mostram os valores V das associações feitas. A partir daí, foi sugerido pelo programa o uso dos genes mais estáveis, com menor valor M (FIGURAS 13 e 14).

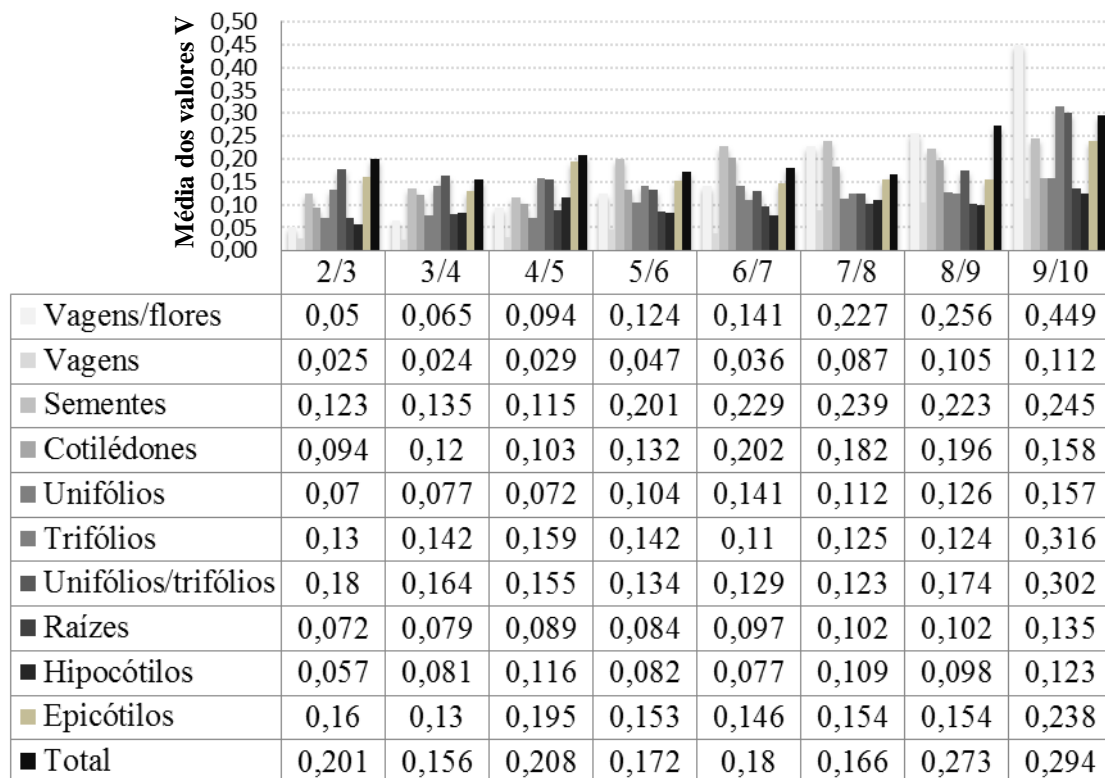
#### 6.4 Expressão gênica da SBTX avaliada por qRT-PCR

Transcritos dos genes codificadores das subunidades de 17 kDa e 27 kDa da SBTX foram encontrados em todos os tecidos vegetais analisados. Níveis mais elevados de transcritos da subunidade de 17 kDa da SBTX foram detectados nos cotilédones, folhas unifolioladas, raízes e epicótilos, quando considerados 10 DAS, ocorrendo um decaimento na expressão ao longo do desenvolvimento da planta (FIGURA 15). A predominância nesses tecidos, exceto nas raízes, também foi verificada para transcritos de genes da subunidade de 27 kDa da toxina em estudo. No caso dessa subunidade, foram ainda detectados altos níveis de transcritos nos cotilédones e nas folhas unifolioladas 22 DAS (FIGURA 16).

Nas sementes, transcritos dos genes relacionados às subunidades de 17 kDa e 27 kDa tiveram aumento de expressão ao longo do enchimento dos grãos, atingindo taxas máximas nas sementes maduras (FIGURAS 17 e 18).

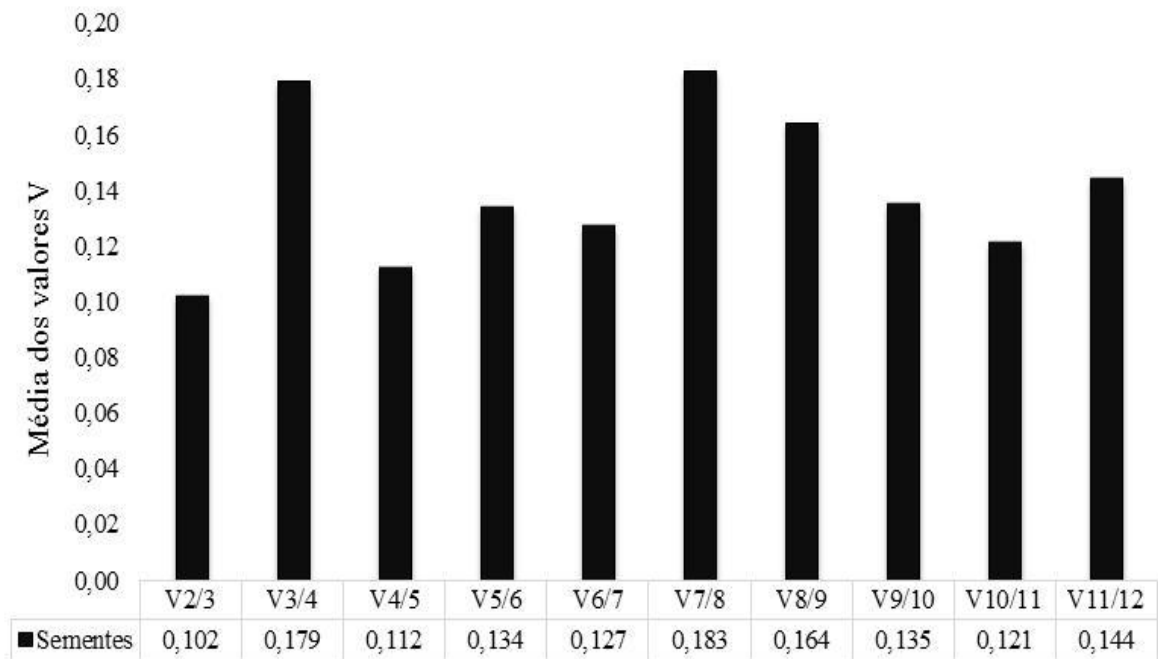
A Tabela 13 mostra a relação entre os valores de expressão dos transcritos dos genes *SBTX27* e *SBTX17* em diferentes tecidos vegetais. Particularmente nos cotilédones 10 e 22 DAS e nas folhas unifolioladas 22 DAS, essa relação apresentou valores (20,72; 155,60 e 19,97, respectivamente) bem mais elevados do que os verificados nos outros tecidos analisados, representando uma maior taxa de transcrição do gene da subunidade de 27 kDa em relação àquela da subunidade de 17 kDa da toxina da soja. Nas folhas unifolioladas 10 DAS e trifolioladas 10, 22 e 45 DAS, assim como nas sementes, os valores (0,47 a 2,53) detectados foram bem inferiores aqueles acima mostrados.

Figura 11 - Valores V gerados pelo programa geNorm para normalização dos dados dos tecidos vegetativos, flores e vagens



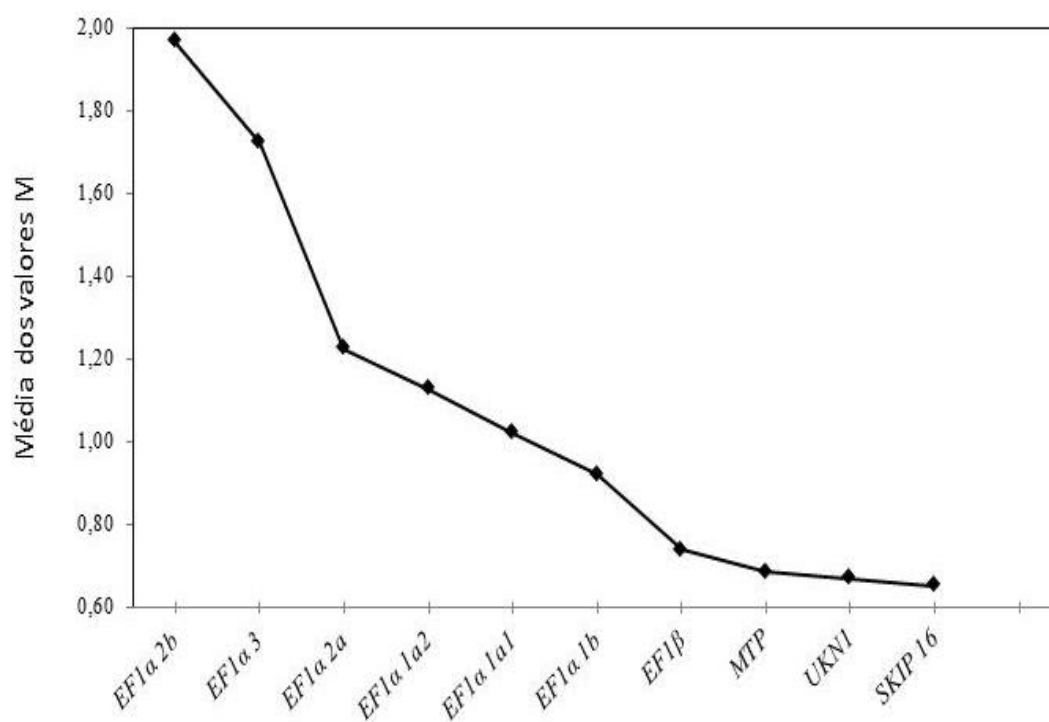
Fonte: Saraiva, *et al.* (2014).

Figura 12 - Valores V gerados pelo programa geNorm para normalização dos dados de sementes



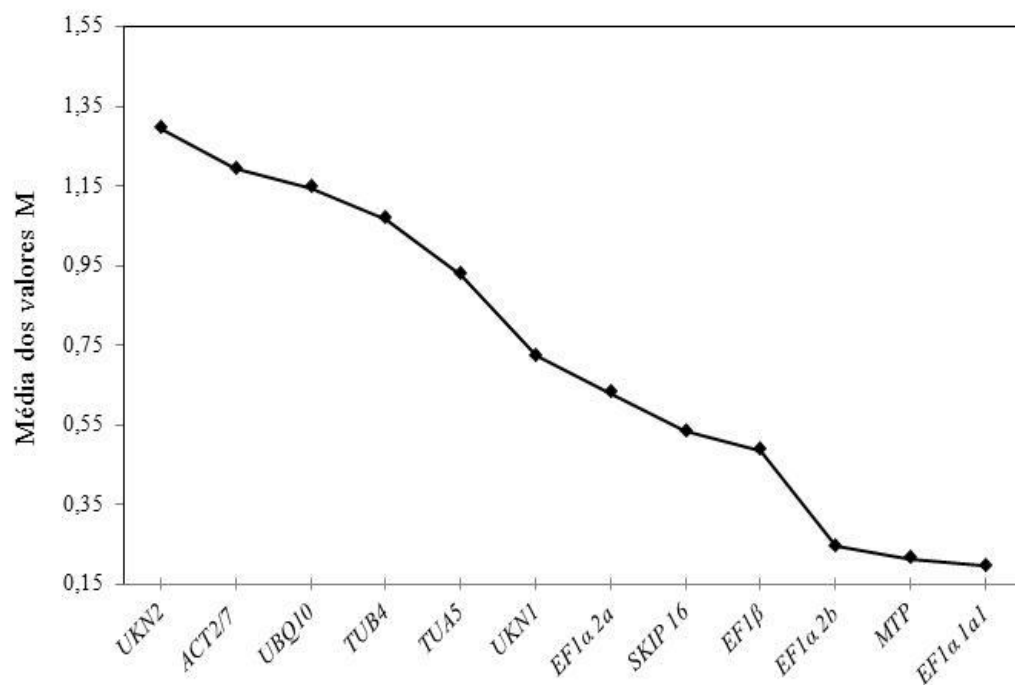
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Estabilidade de expressão dos genes potenciais de referência para amostras dos tecidos vegetativos, vagens e flores pelo programa geNorm



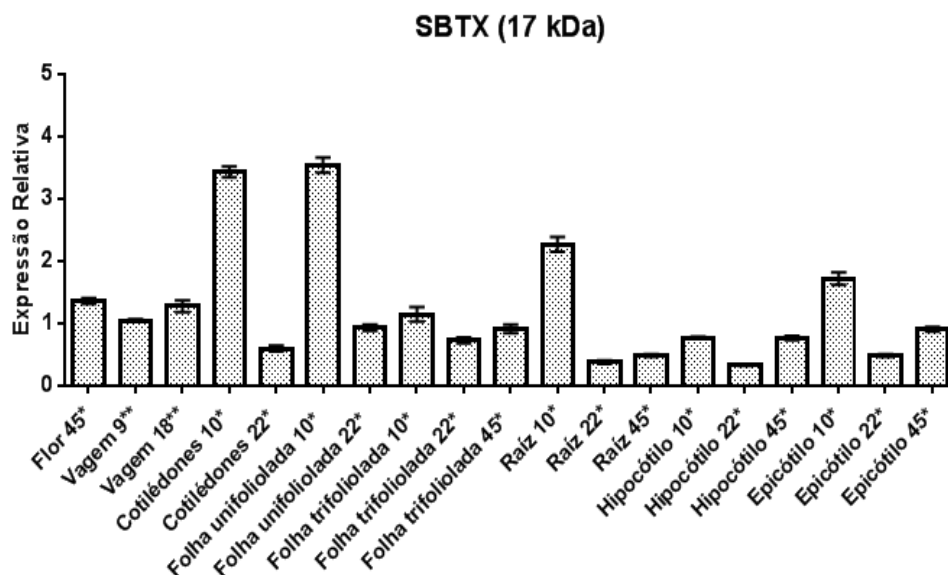
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 - Estabilidade de expressão dos genes potenciais de referência para amostras de sementes pelo programa geNorm



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Expressão relativa do gene *SBTX 17*, referente à subunidade de 17 kDa da toxina, ao longo do desenvolvimento da soja

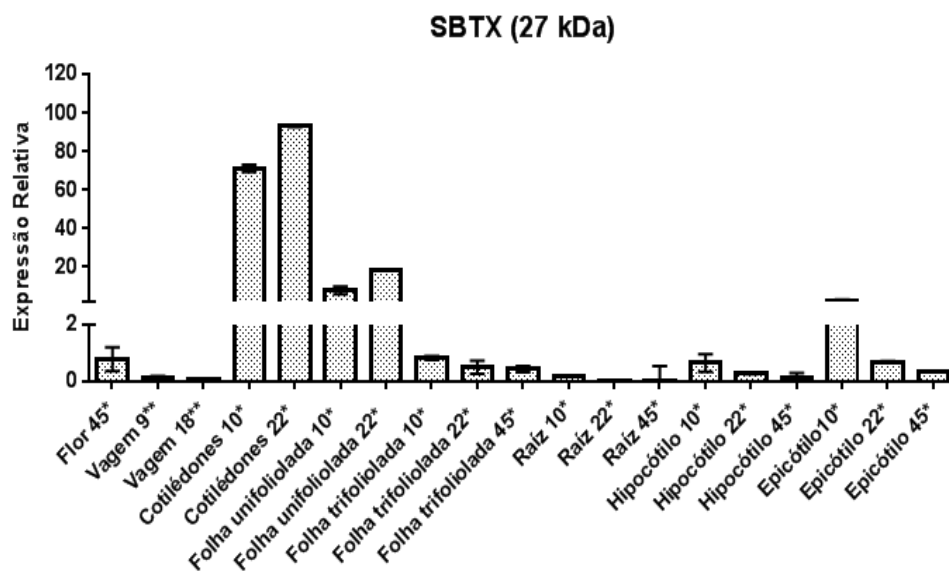


Fonte: Elaborada pela autora.

A normalização do nível de expressão do gene de interesse foi realizada a partir dos níveis de expressão dos genes *MTP*, *SKIP 16* e *UKN1*. As amostras analisadas foram obtidas a partir de extratos de RNA total dos seguintes tecidos: raízes, hipocótilos, epicótilos, folhas unifolioladas, folhas trifolioladas, cotilédones, vagens e flores em diferentes fases de desenvolvimento da planta. (\*) Dias após a semeadura. (\*\*) Dias após a floração.



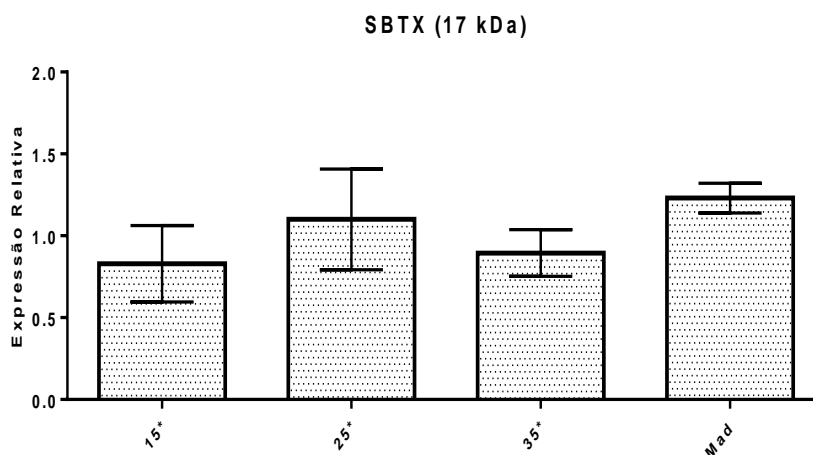
Figura 16 - Expressão relativa do gene *SBTX* 27, referente à subunidade de 27 kDa da toxina, ao longo do desenvolvimento da soja



Fonte: Elaborada pela autora.

A normalização do nível de expressão do gene de interesse foi realizada a partir dos níveis de expressão dos genes *MTP*, *SKIP 16* e *UKN1*. As amostras analisadas foram obtidas a partir de extratos de RNA total dos seguintes tecidos: raízes, hipocótilos, epicótilos, folhas unifolioladas, folhas trifolioladas, cotilédones, vagens e flores em diferentes fases de desenvolvimento da planta. (\*) Dias após a semeadura. (\*\*) Dias após a floração.

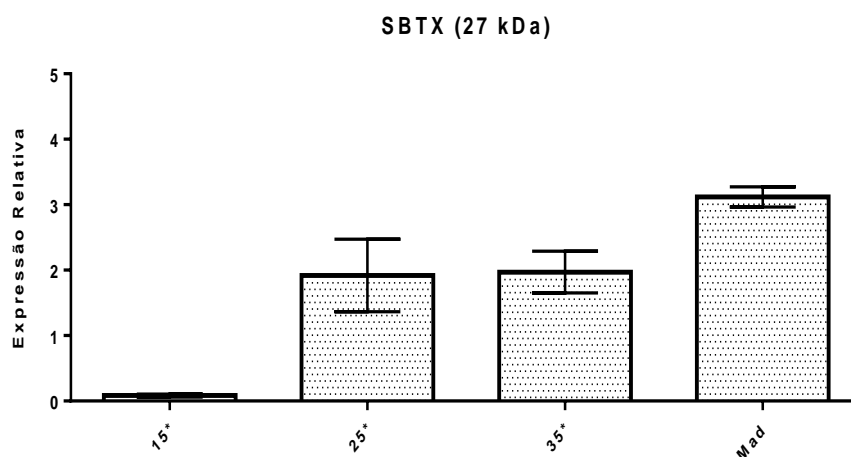
Figura 17 - Expressão relativa do gene *SBTX 17*, referente à subunidade de 17 kDa da toxina, ao longo do enchimento do grão de soja



Fonte: Elaborada pela autora.

A normalização do nível de expressão do gene de interesse foi realizada a partir dos níveis de expressão dos genes *MTP* e *EFl $\alpha$ 5a*. As amostras analisadas foram obtidas a partir de extratos de RNA total de sementes ao longo do enchimento do grão. (\*) Dias após a floração. (Mad) Semente madura.

Figura 18 - Expressão relativa do gene *SBTX 27*, referente à subunidade de 27 kDa da toxina, ao longo do enchimento do grão de soja



Fonte: Elaborada pela autora.

A normalização do nível de expressão do gene de interesse foi realizada a partir dos níveis de expressão dos genes *MTP*, *EF1a1 2a* e *EF1a2b*. As amostras analisadas foram obtidas a partir de extratos de RNA total de sementes ao longo do enchimento do grão. (\*) Dias após a floração. (Mad) Semente madura.

Tabela 13 - Relação entre os valores de expressão dos transcritos dos genes *SBTX27* e *SBTX17* em diferentes tecidos vegetais, durante estádios distintos de desenvolvimento da soja

<b>Tecido</b>	<b>Idade</b>	<b>Transcritos <i>SBTX27</i>/<i>SBTX17</i></b>
Cotilédones	10 DAS	20,72
	22 DAS	155,60
Folhas unifolioladas	10 DAS	2,21
	22 DAS	19,97
Folhas trifolioladas	10 DAS	0,72
	22 DAS	0,69
	45 DAS	0,47
Raízes	10 DAS	0,08
	22 DAS	0,02
	45 DAS	0,03
Epicótilos	10 DAS	1,51
	22 DAS	1,44
	45 DAS	3,54
Hipocótilos	10 DAS	0,85
	22 DAS	0,80
	45 DAS	0,14
Flores	45 DAS	0,57
Vagens	09 DAF	0,11
	18 DAF	0,05
Sementes	15 DAF	1,08
	25 DAF	1,74
	35 DAF	2,21
	Madura	2,53

Fonte: Elaborada pela autora.

DAS – Dias após a semeadura; DAF – Dias após a floração.

## **ETAPA 2: NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE SBTX EM FOLHAS DE SOJA TRATADAS COM ELICITORES BIÓTICO E ABIÓTICO**

### **6.5 - Propriedades do RNA extraído das folhas primárias submetidas aos diferentes tratamentos**

Os valores médios das concentrações e relações de absorbâncias de amostras de RNA total extraído de folhas primárias de plantas submetidas aos diferentes tratamentos abiótico e biótico estão mostrados na Tabela 14. As concentrações de RNA total extraído nas diferentes amostras variaram de 147,80 ng/μL a 1281,00 ng/μL. A pureza do RNA extraído foi satisfatória pois, suas relações A260/280 e A260/230 tiveram valores próximos a 2. O RNA total obtido de cada amostra também se mostrou íntegro, uma vez que as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S foram evidentes (FIGURA 20).

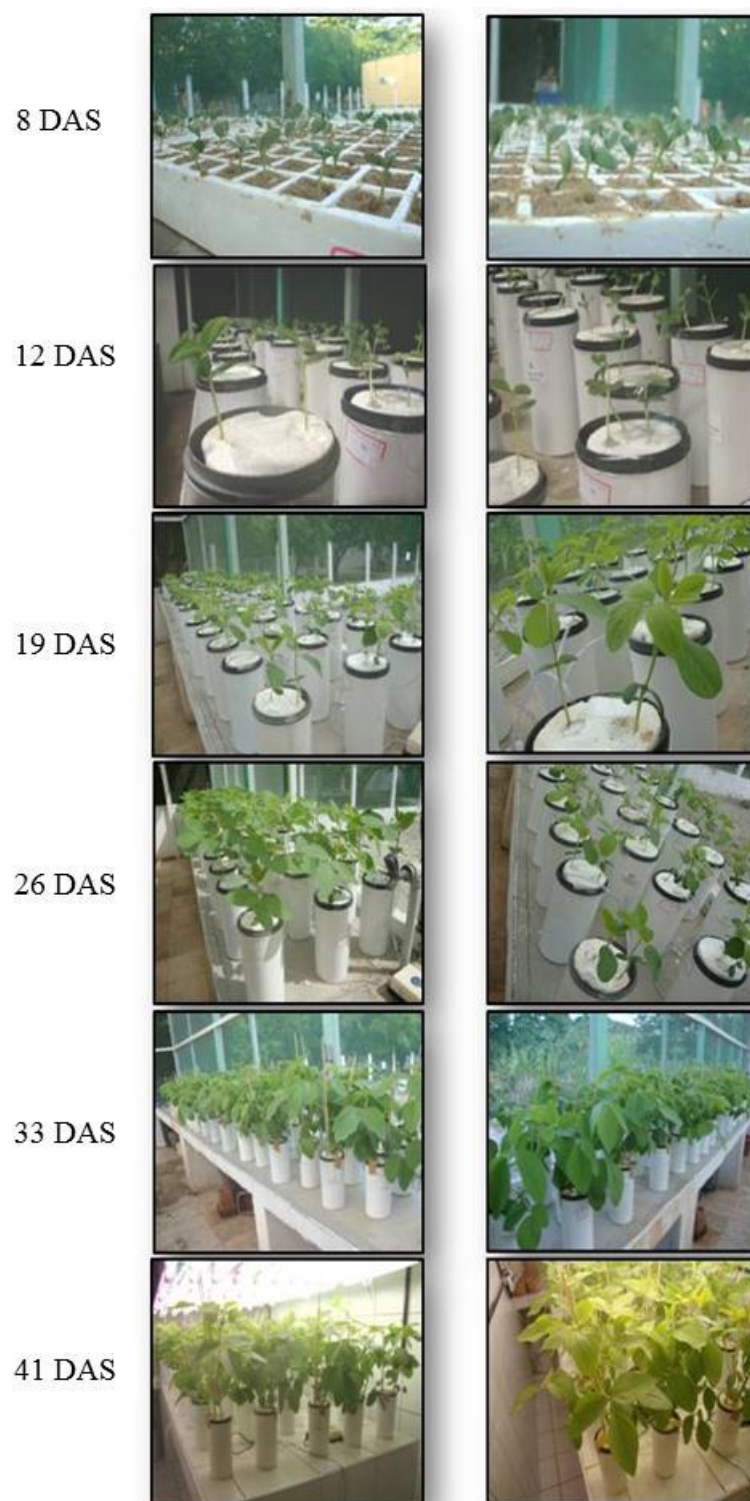
### **6.6 - Qualidade do cDNA sintetizado**

A Figura 21 demonstra o sucesso de amplificação dos cDNAs utilizando o gene da actina como iniciador.

### **6.7 - Padronização dos genes de referência para qRT-PCR**

Para normalização dos resultados de qRT-PCR, foram escolhidos como candidatos os genes descritos nas Tabelas 10 e 11 para as folhas tratadas com ácido salicílico 5 mM e com o fungo *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL), respectivamente. Os dados obtidos a partir do

Figura 19 - Desenvolvimento da soja em casa de vegetação



Fonte: Elaborada pela autora.

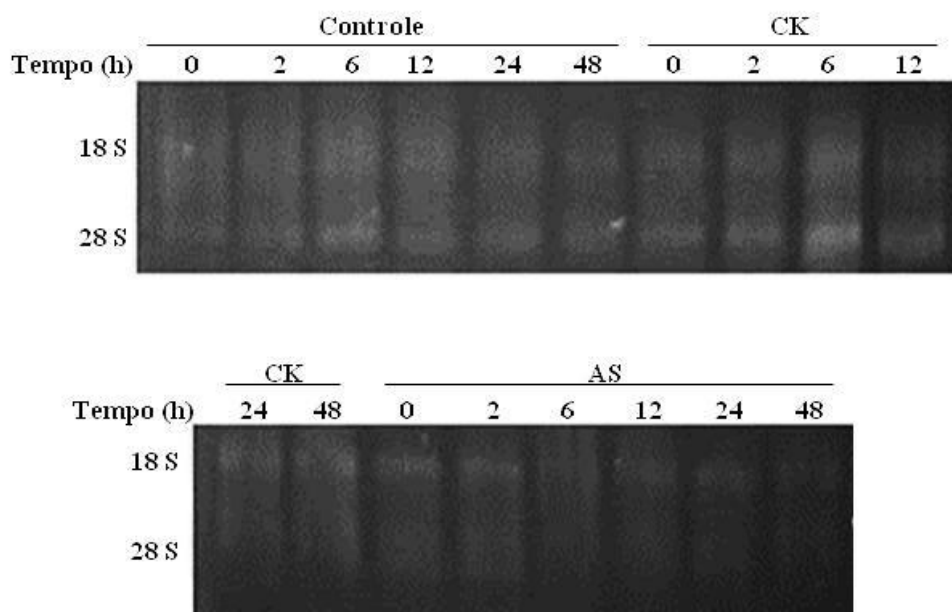
DAS – Dias após a semeadura.

Tabela 14 - Valores médios das concentrações e relações de absorbâncias dos extratos de RNA total de folhas primárias de soja submetidas aos diferentes tratamentos abiótico e biótico

Tratamento	Tempo (h)	Média das concentrações( $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ )	Relação 260/280	Relação 260/230
Água (controle)	0	970,00	2,13	2,41
	2	1281,00	2,15	2,29
	6	860,00	2,14	2,40
	12	464,00	2,12	1,97
	24	388,00	2,14	1,95
	48	493,00	2,11	2,15
Ácido Salicílico 5 mM	0	450,90	2,13	1,99
	2	147,80	1,95	1,09
	6	329,90	2,13	2,30
	12	523,80	2,12	1,99
	24	701,00	2,05	1,88
	48	424,80	2,12	1,85
<i>C. kikuchii</i>	0	409,40	1,98	2,13
	2	817,70	2,03	2,10
	6	382,30	2,08	2,11
	12	578,30	1,92	2,06
	24	420,40	2,11	2,12
	48	1149,70	2,05	2,15

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) do RNA extraído de folhas primárias de plantas de soja submetidas aos tratamentos abiótico e biótico

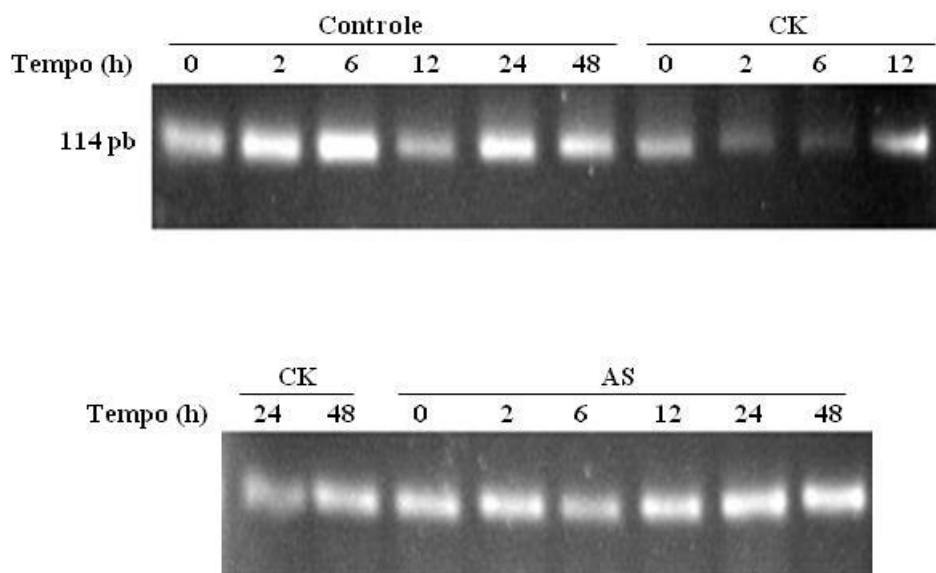


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Foram aplicados 0,5 µg de RNA total de cada amostra. As folhas foram tratadas com água (controle), ácido salicílico 5 mM (AS) e inoculadas com o fungo *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL) (CK).



Figura 21 - Perfil eletroforético em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene da actina, evidenciando a qualidade do cDNA produzido na PCR semiquantitativa (35 ciclos)



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Foram aplicados 0,5 µg de cDNA total de cada amostra. As folhas foram tratadas com água (controle), ácido salicílico 5 mM (AS) e inoculadas com *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL) (CK).

programa geNorm (valores V) sugeriram a utilização de sete genes para a normalização de cada tratamento (FIGURA 22). As Figuras 23 e 24 mostram os valores M para cada tratamento, tendo sido selecionados aqueles com menores valores. Para o tratamento com ácido salicílico 5 mM foram utilizados os genes *EF1α1a1*, *EF1α2a*, *EF1α2b*, *UKN1*, *SKIP 16*, *ACT*. Já para o tratamento com o fungo *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL) foram usados os genes *EF1α1a1*, *EF1α2a*, *EF1α2b*, *ACT*, *ACT 11* e *EF1β*.

## 6.8 Expressão gênica da SBTX analisada por qRT-PCR

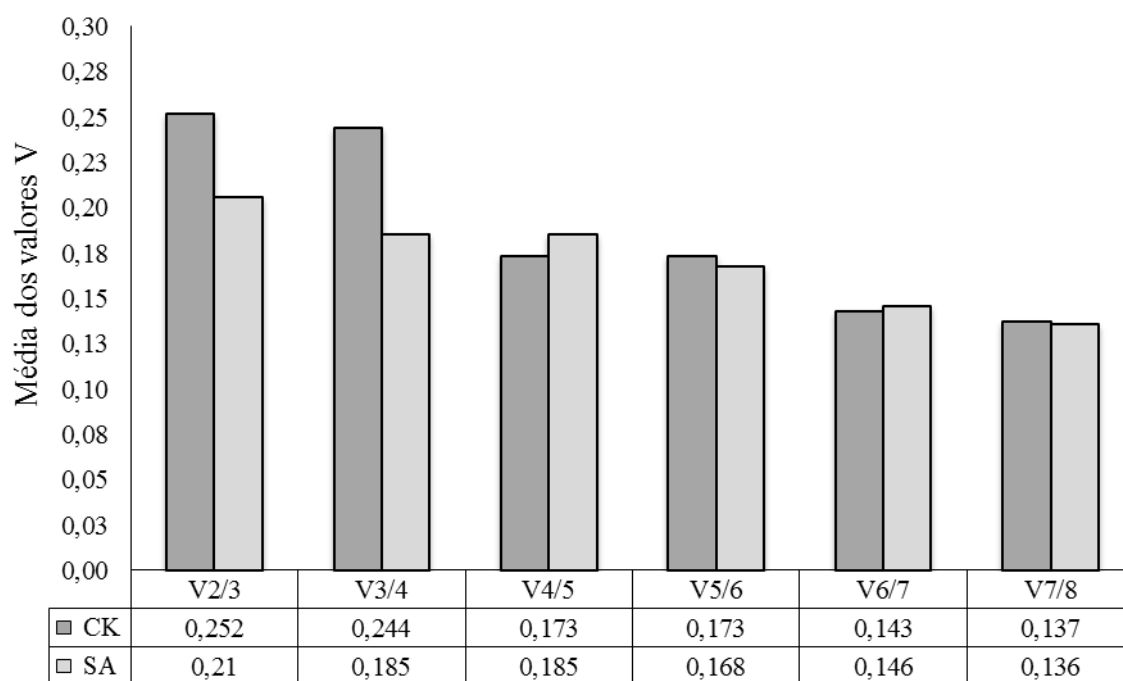
A Figura 25 descreve o perfil de expressão gênica de *PR3* e dos genes que codificam as subunidades da SBTX em folhas submetidas aos tratamentos abióticos e biótico.

O gene *PR3* foi responsivo a ambos os tratamentos. Um pico de expressão desse gene ocorreu 2 horas após o tratamento com ácido salicílico, havendo em seguida um declínio na taxa de transcrito (FIGURA 25F). Quando folhas foram inoculadas com *C. kikuchii*, dois picos de expressão foram observados, com 12 horas e 48 horas após o tratamento (FIGURA 25E).

Em relação à SBTX, o tratamento com ácido salicílico causou uma indução na taxa de transcrito relacionado ao gene *SBTX17*, 24 e 48 horas após o tratamento, em relação ao controle (FIGURA 25B). O gene *SBTX27* foi também responsivo ao tratamento com ácido salicílico, porém o pico da resposta ocorreu mais cedo, 12 horas após o tratamento (FIGURA 25D). Além disso, a taxa de transcrito relacionado à subunidade de 27 kDa da toxina foi cerca de 2 vezes maior àquela verificada para a subunidade de 17 kDa, quando considerados seus respectivos picos de expressão.

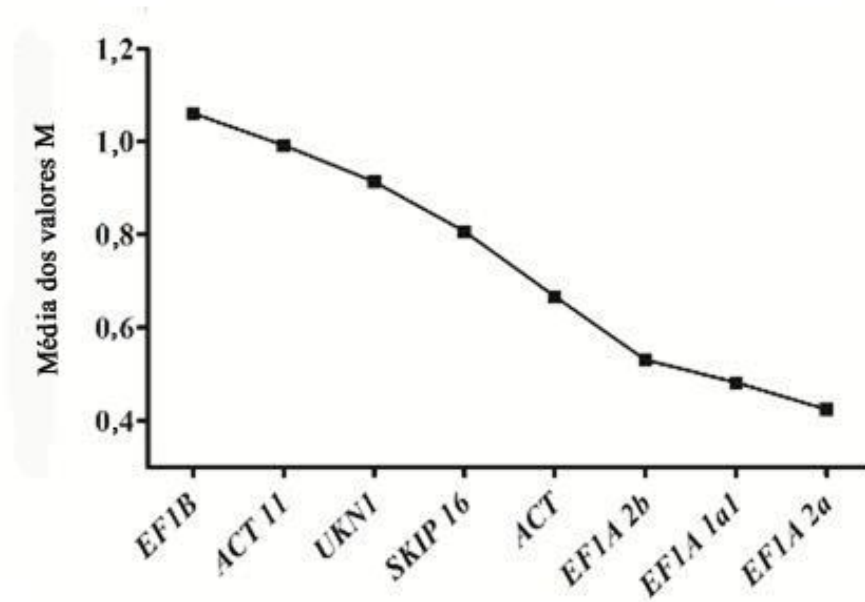
O fungo *C. kikuchii* também foi capaz de induzir a expressão de ambos os genes codificadores das subunidades da SBTX (FIGURAS 25A e 25C). Nesse caso, uma resposta mais sincronizada entre os diferentes genes foi observada, tanto no que se refere ao tempo de expressão, como à taxa de transcritos. Os picos de transcrição foram verificados 6 e 12 horas após a inoculação das folhas primárias com os conídios do fungo. A partir de 12 horas, embora a resposta ainda tenha se mostrado expressiva, um decaimento na taxa de transcritos foi observado para ambos os genes, particularmente com 48 horas após o tratamento.

Figura 22 - Valores V gerados pelo programa geNorm para normalização dos dados resultantes dos tratamentos com ácido salicílico 5 mM (AS) e *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL) (CK)



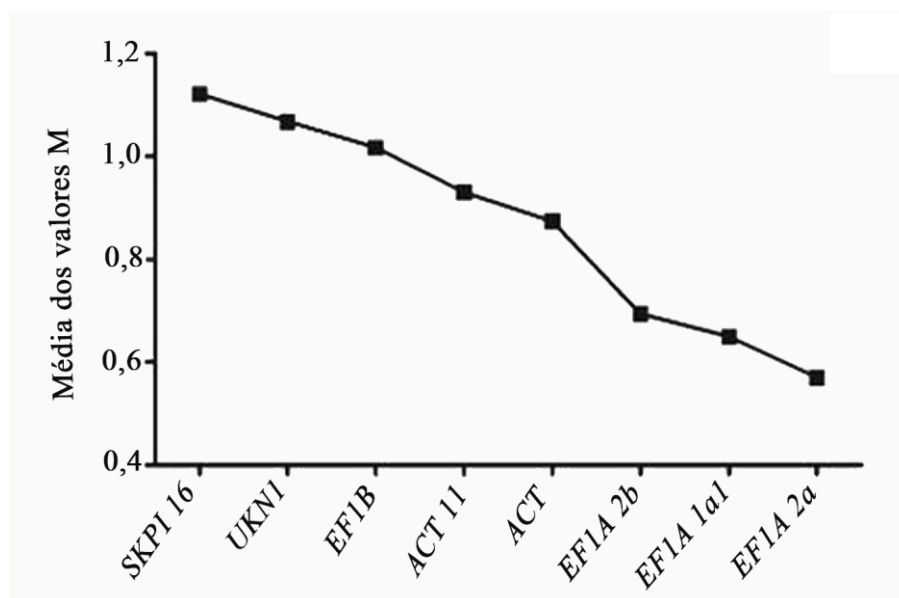
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 - Estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência para análises em amostras de folhas primárias de soja submetidas ao tratamento com ácido salicílico 5 mM, usando o programa geNorm



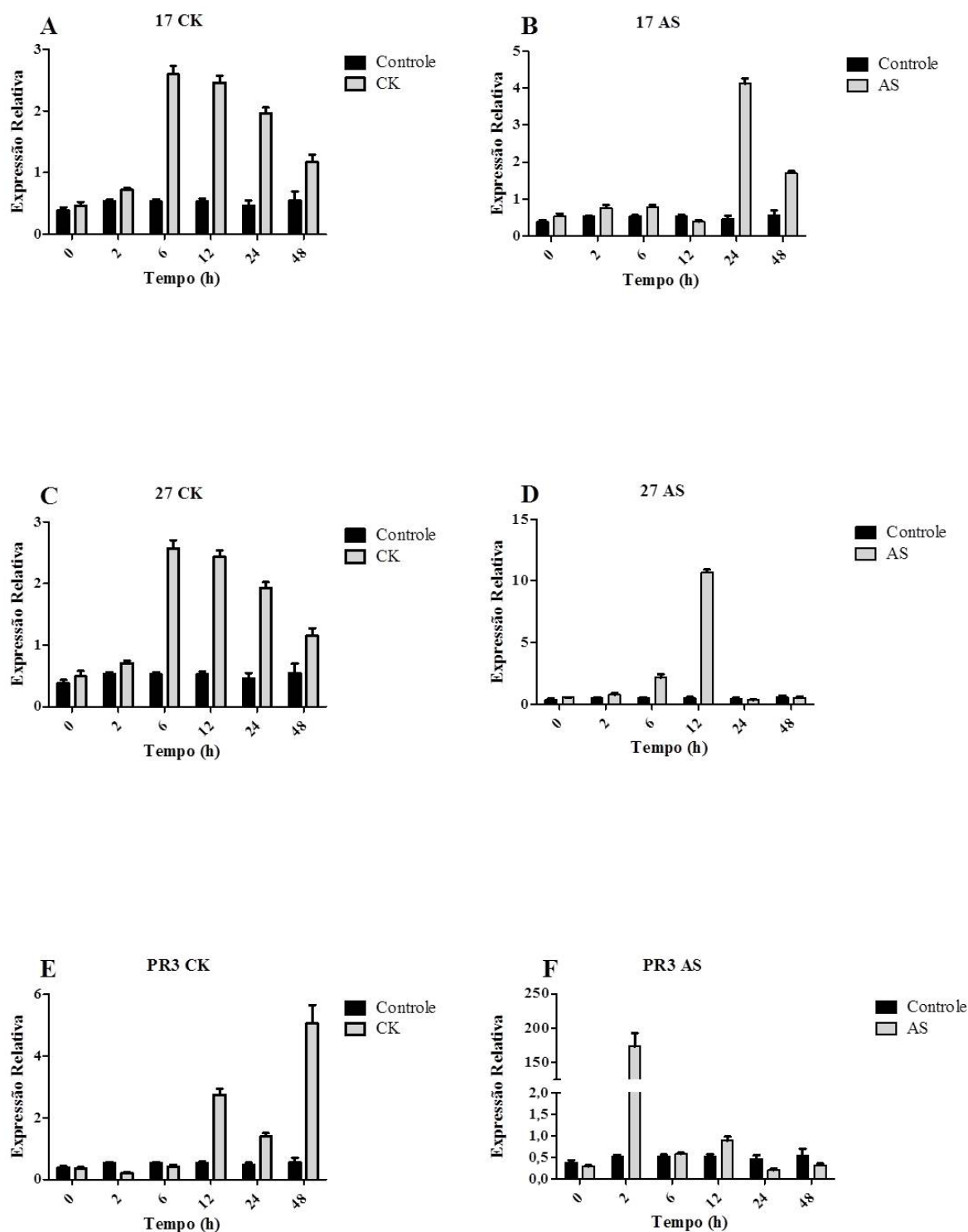
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 - Estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência para análises em amostras de folhas primárias de soja submetidas ao tratamento com *C. kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL), usando o programa geNorm



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25 - Expressão relativa dos genes *SBTX17*, *SBTX27* e *PR3* em folhas de soja submetidas aos tratamentos com elicitores abiótico e biótico



Fonte: Elaborada pela autora.

Perfis de expressão gênica dos genes *SBTX17* (A e B), *SBTX27* (C e D) e *PR3* (E e F) em folhas de soja submetidas aos tratamentos com (B, D e F) ácido salicílico 5 mM (AS) e (A, C e E) inoculadas com *Cercospora kikuchii* ( $2 \times 10^5$  conídios/mL).

### **ETAPA3: IMUNOLocalização da SBTX em sementes maduras de soja**

#### **6.9 Acúmulo de SBTX**

Para obtenção de anticorpos anti-SBTX, vários ciclos de purificação dessa proteína foram realizados. A fração do extrato total precipitada com sulfato de amônio na faixa de saturação de 20-55%, contendo SBTX, apresentou rendimento médio de 90 mgP/mL. O perfil cromatográfico dessa fração em matriz de DEAE-Celulose está mostrado na Figura 27. O material não-retido, concentrado com sulfato de amônio a 90% de saturação e dialisado, quando submetido à cromatografia de troca iônica em matriz de CM-Sepharose, resultou em frações proteicas distintas, não-retidas e retida à matriz (FIGURA 28). O material proteico retido eluído pelo acréscimo de 0,2 M de NaCl ao tampão de equilíbrio correspondeu à SBTX e sua pureza foi constatada por PAGE-SDS (FIGURA 29).

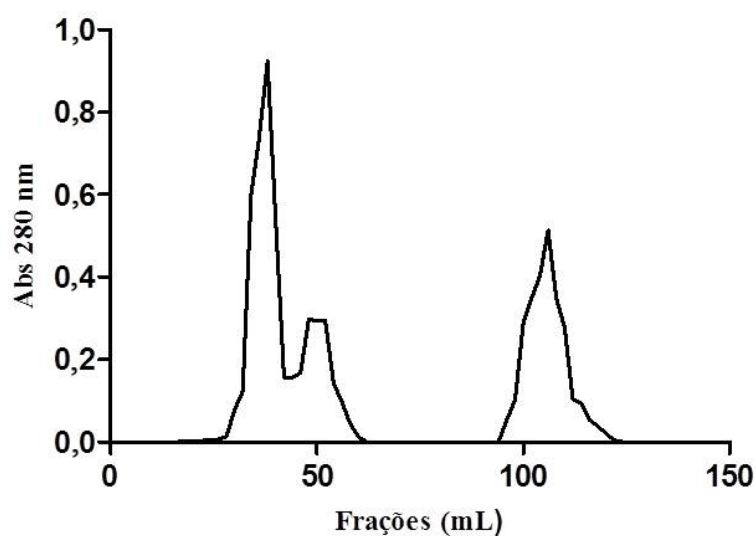
#### **6.10 Anticorpos anti-SBTX**

O antissoro produzido em coelhos imunizados com SBTX após cromatografia em matriz de Proteína A-Agarose P-2545 apresentou o perfil mostrado na Figura 30, onde a fração retida corresponde às imunoglobulinas do tipo IgG. A solução estoque de anticorpo anti-SBTX (1 mg/mL), preparada em água grau Milli-Q, mostrou-se capaz de reconhecer a SBTX mesmo na mais alta diluição testada (1:500) (FIGURA 31).

#### **6.11 Imunohistoquímica**

De posse dos anticorpos anti-SBTX, prosseguiu-se a investigação da localização de SBTX em cotilédones de soja através de imunohistoquímica. A reação da peroxidase com o seu substrato (DAB) ocorreu na região da epiderme dos cotilédones, conforme coloração marrom nítida e inequívoca nessa região (FIGURA 32B), visto que cortes tratados apenas com o soro pré-imune não apresentaram essa coloração (FIGURA 32A).

Figura 26 - Perfil cromatográfico em matriz de DEAE-Celulose

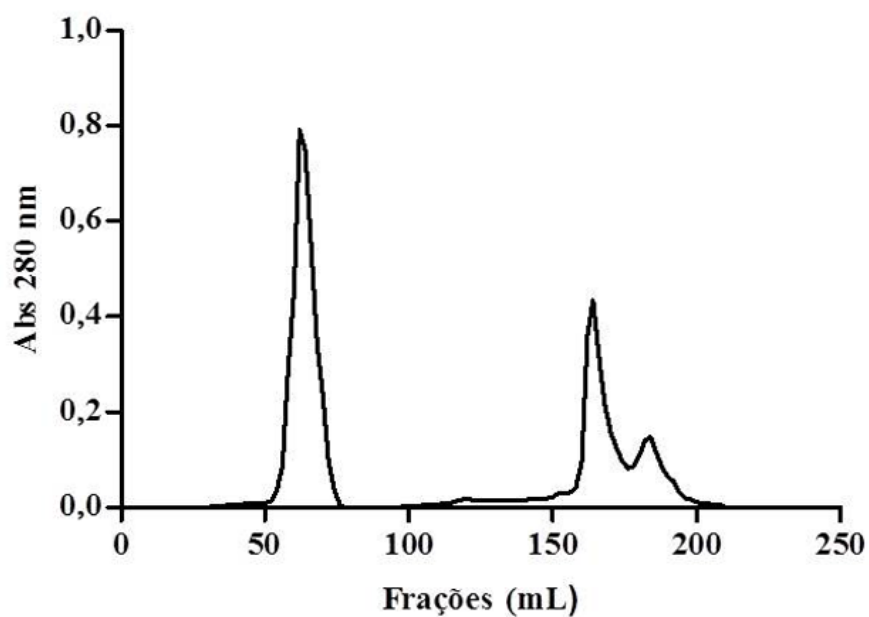


Fonte: Elaborada pela autora.

A fração 20-55% (800 mg), obtida por precipitação com sulfato de amônio do extrato total, foi submetida à cromatografia em matriz de DEAE-Celulose (38,0 x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. Fluxo: 90 mL/h; Frações: 2 mL.



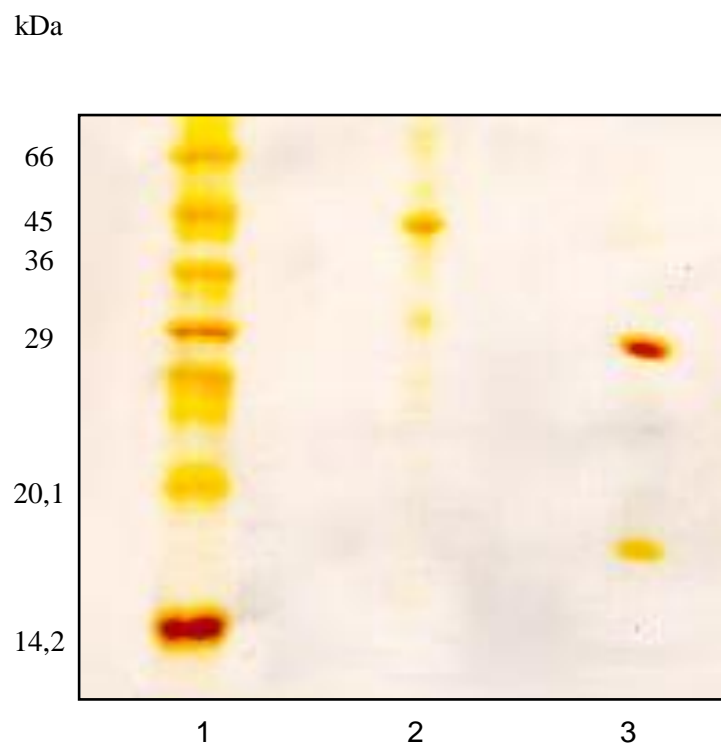
Figura 27 - Perfil cromatográfico em matriz de CM-Sepharose



Fonte: Elaborada pela autora.

A fração (20 mg) não-retida na matriz de DEAE-Celulose, após concentração (0-90%) com sulfato de amônio e diálise, foi submetida à cromatografia em matriz de CM-Sepharose (38,0 x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. SBTX foi eluída com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,2 M. Fluxo: 40 mL/h; Frações: 2 mL.

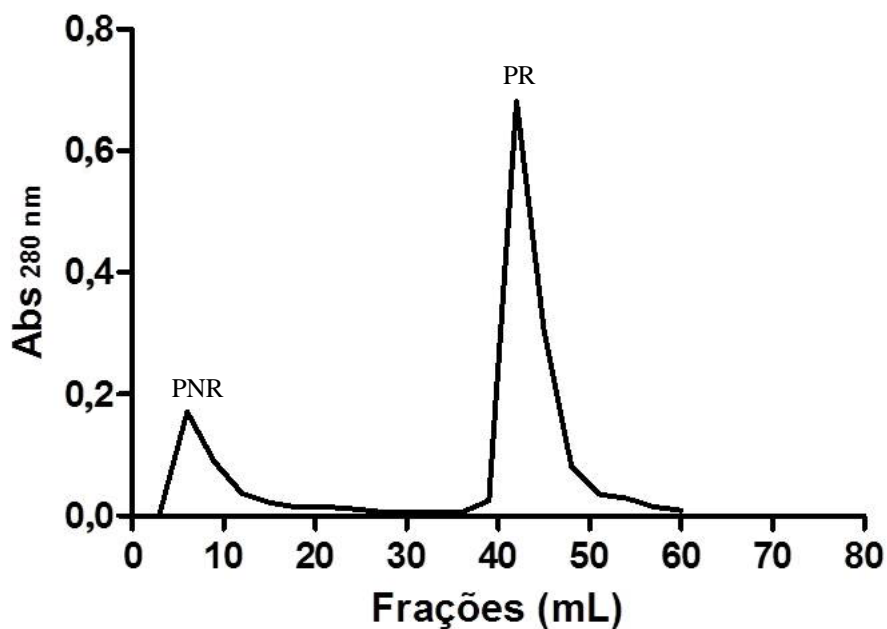
Figura 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (17,5%) da SBTX na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol e SDS, revelada com prata



Fonte: Elaborada pela autora.

Raia 1 – Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina – 66 kDa; albumina do ovo – 45 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – 36 kDa; anidrase carbônica – 29 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactoalbumina – 14,2 kDa). Raia 2 – SBTX na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, Raia 3 – SBTX na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 5%.

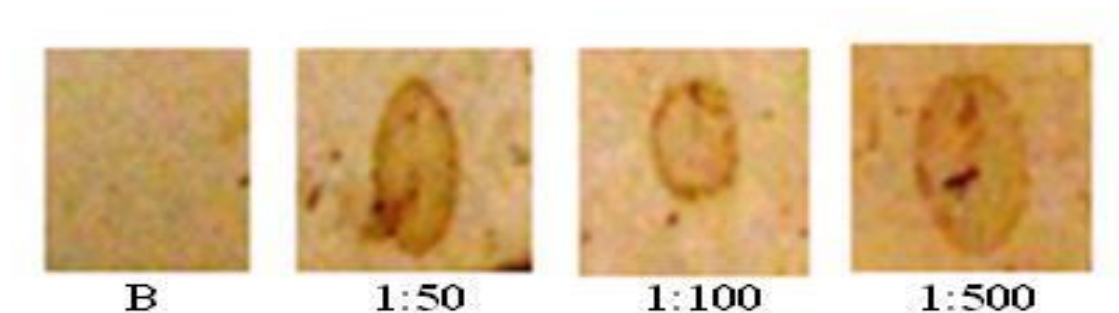
Figura 29 - Perfil cromatográfico do antissoro produzido em coelhos imunizados com SBTX após cromatografia de afinidade em matriz de Proteína A–Agarose P2545



Fonte: Elaborada pela autora.

O antissoro (10 mg) produzido em coelhos imunizados com SBTX, após precipitação com sulfato de amônio sólido a 33% de saturação e diálise, foi submetido à cromatografia em matriz de Proteína A-Agarose P-2545, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A eluição do material não retido (PNR) foi realizada com o próprio tampão de equilíbrio, ao passo que o material retido (PR, rico em IgG policlonal anti-SBTX) foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 3,0. Fluxo de 1,2 mL/minuto; Fração: 3 mL.

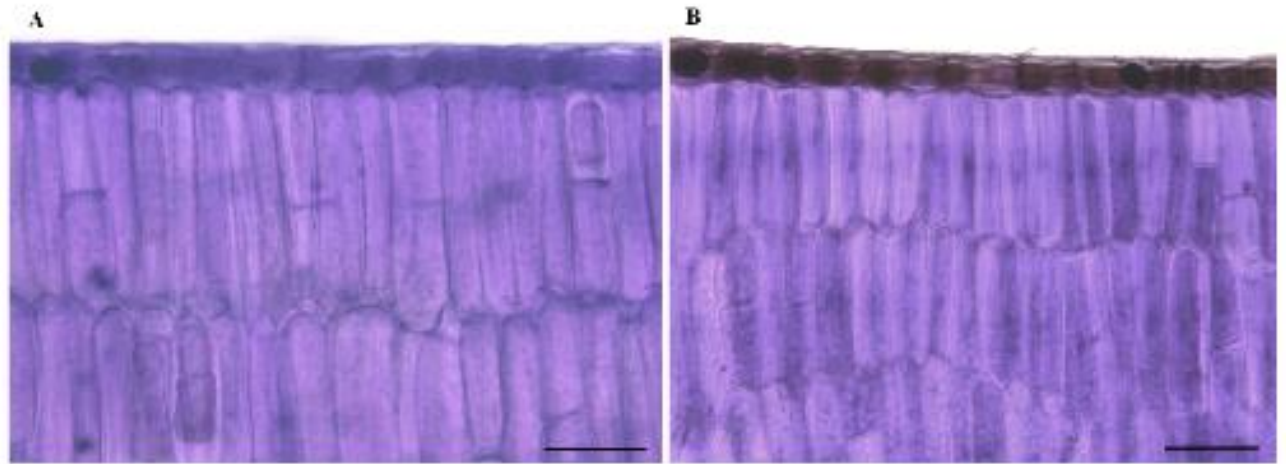
Figura 30 - Titulação dos anticorpos anti-SBTX obtidos a partir da imunização do coelho com SBTX



Fonte: Elaborada pela autora.

SBTX (10  $\mu$ g) foi aplicada em membranas de PVDF, submetidas à incubação posterior com IgG anti-SBTX nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:500. No branco (B), ao invés da proteína foi aplicado o mesmo volume de água grau milli-Q. A revelação das membranas foi feita utilizando o anticorpo secundário acoplado à peroxidase (1:2000) juntamente com seu substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Figura 31 - Cortes transversais de cotilédones de soja submetidos à imunolocalização de SBTX



Fonte: Elaborada pela autora.

Cortes de cotilédones de soja foram submetidos a reação entre a peroxidase acoplada ao anticorpo secundário e seu substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Hematoxilina de Harris (coloração azulada) foi usada como contracorante. (A) corte tratado previamente apenas com soro pré-imune de coelho, representando o branco da reação e (B) corte tratado previamente com IgG anti-SBTX (1:50), mostrando deposição de pigmento marrom na epiderme (ep) do cotilédone, evidenciando reconhecimento da SBTX pelo anticorpo primário. A barra preta representa a escala de 50  $\mu$ m.

## 7 DISCUSSÃO

Os grãos de soja constituem uma das fontes mais barata de proteína com alto valor nutricional, predominando no mercado mundial das leguminosas (LIU, 2008). Apesar de se sua proeminência, a soja é suscetível a diversos fatores ambientais que limitam sua produtividade, dentre eles o ataque pelos fungos fitopatogênicos, acarretando grandes prejuízos nas lavouras (KUBOTA; SHIMITSU, 2009). Diante desse obstáculo, emerge a necessidade de busca de moléculas naturais capazes de inibir a progressão de doenças fúngicas sem causar impactos ambientais. Dentre as moléculas presentes na soja com potencial de uso para essa finalidade, destaca-se a toxina da soja, denominada abreviadamente de SBTX, uma proteína isolada de sementes, que é composta por duas subunidades (17 e 27 kDa) e ativa contra fungos de relevância agrônômica, incluindo *C. soja* e *C. kikuchii*, patógenos naturais da soja (SIEBRA, 2004; MORAIS, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2008; MORAIS, 2010).

Apesar da atividade antifúngica de SBTX ser bem caracterizada, informações referentes tanto ao seu papel fisiológico no desenvolvimento da soja, bem como se sua expressão responderia à presença de elicitores e, ainda, sobre a localização tecidual dessa proteína ainda são escassas. Portanto, sabendo-se que, mesmo dentro de um tecido, um grande número de proteínas específicas pode ter sua expressão diferentemente regulada em vários estágios de desenvolvimento (NOZU; TSUGITA; KAMIJO, 2006), surgiram as seguintes indagações: Os transcritos dos genes codificadores de ambas as subunidades de SBTX estariam também presentes em outros tecidos da soja, além das sementes? Os perfis de expressão relativa desses transcritos seriam similares em plantas submetidas ou não a estresses abiótico e biótico? Já que evidências mostram que SBTX pode estar relacionada com a defesa vegetal, onde ela encontra-se localizada na semente, órgão vegetal utilizado para o seu isolamento?

Para condução do presente trabalho, a cultivar BRS-Pala foi selecionada, particularmente por apresentar características de resistência a várias doenças, incluindo cancro da haste, mancha do olho-de-rã, mosaico comum, oídio, podridão parda da haste, podridão radicular de fitóftora e pústula bacteriana e, ainda, ao acamamento. Além disso, esta cultivar apresenta elevado teor proteico (em torno de 38,8%), ciclo semitardio e desenvolvimento determinado (EMBRAPA, 2010).

Os tecidos obtidos a partir do plantio foram utilizados para avaliar o perfil de expressão gênica constitutiva de SBTX ao longo do desenvolvimento da soja, bem como para

averiguar se os genes codificadores desta proteína seriam induzidos sob os tratamentos com elicitores abiótico e biótico, como o ácido salicílico e o fungo *C. kikuchii*, respectivamente. Para essas análises, a técnica de qRT-PCR foi usada, tendo sido necessária a obtenção prévia de RNA total dos tecidos vegetais de interesse e a respectiva síntese de cDNA (TABELAS 12 e 14; FIGURA 09, 10, 21 e 22).

De posse dos cDNAs das amostras de interesse e com os genes normalizadores definidos, análises de qRT-PCR foram conduzidas com o objetivo principal de avaliar o perfil de transcritos relacionados às duas subunidades da SBTX. Primeiramente, foi dada ênfase à análise da distribuição dos transcritos dos genes da SBTX nos diferentes tecidos vegetais (vegetativos e reprodutivos), durante fases distintas do desenvolvimento da soja. Interessantemente, ainda que de forma diferenciada, transcritos dos genes codificadores de ambas as subunidades da SBTX mostraram-se presentes praticamente em todos os tecidos vegetais analisados (FIGURAS 15 e 16). Esses dados estão em concordância com aqueles encontrados por Siebra (2004), que detectou a presença de SBTX em raízes, caules e folhas de plântulas estioladas de soja no decorrer de 12 dias após a germinação, usando as técnicas de Western blot e ELISA.

A presença constitutiva e a ocorrência generalizada dos genes codificadores da SBTX em toda a planta sugerem papéis fisiológicos importantes para essa proteína, além da função de defesa. Colocação semelhante foi feita para PR-proteínas. Van Loon, Rep e Pieterse (2006) defenderam que PR-proteínas podem desempenhar papéis diretamente ligados ao desenvolvimento das plantas e que, através de suas atividades enzimáticas, são passíveis de gerar moléculas sinalizadoras, capazes de atuar como elicitores endógenos na morfogênese. Há relatos do envolvimento de PR2 e PR3 na germinação ao degradar a parede celular da semente, permitindo a emergência da radícula, além de proteger a semente contra invasão microbiana (MOROHASHI; MATSUSHIMA, 2000; WU *et al.*, 2001; LEUBNER-METZGER, 2005).

Comparativamente, uma das taxas mais altas de transcritos relacionados à SBTX foi encontrada nos cotilédones (FIGURAS 15 e 16). Estes tecidos consistem no primeiro par de folhas, em eudicotiledonêas, que se formam no embrião. Os cotilédones podem ter aspecto de folha e, após a germinação, apresentar função fotossintetizante ou acumular materiais nutritivos, funcionando como órgão de reserva (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006), nutrindo a planta desde o desenvolvimento do embrião na semente até o estabelecimento da plântula. A presença constitutiva de proteínas relacionadas à defesa em cotilédones pode estar envolvida tanto na demanda energética, requerida no processo de

germinação, como na própria defesa frente às pragas que assolam este tecido. Transcritos de outras proteínas relacionadas à defesa vegetal, tais como peroxidase, metaloprotease, glucanase, fenilalanina amônia liase e quitinase de classe I, já foram detectados nos cotilédones de plântulas de soja (VEGA-SÁNCHEZ *et al.*, 2005).

Além dos cotilédones, as folhas unifolioladas e epicótilos também se sobressaíram na expressão de transcritos relacionados às duas subunidades da SBTX em relação aos demais tecidos vegetais (FIGURAS 15 e 16). No caso da subunidade de 17 kDa, as raízes também apresentaram nível elevado de transcrito. A alta expressão de transcritos dos genes codificadores da SBTX foi observada, na maioria dos casos, quando considerados os tecidos vegetais coletados 10 dias após a semeadura. A expressão gênica acentuada de proteínas específicas em tecidos em crescimento é um fato conhecido. As ciclofilinas, com as quais a sequência NH<sub>2</sub>-terminal da subunidade de 17 kDa apresenta elevada identidade, representam um bom exemplo dessas proteínas (GASSER *et al.*, 1990; MARTY *et al.*, 1993; MARIVET; FREND; BURKARD, 1995). O aumento da expressão de ciclofilinas nos tecidos em crescimento sugere uma correlação entre sua expressão gênica e o estado proliferativo das células. É sabido que ao longo do processo de crescimento de um tecido, há síntese de uma variedade de proteínas e que estas devem passar pelo processo de maturação. Além de atuarem nos processos de dobramento e maturação proteica, há trabalhos destacando o envolvimento de ciclofilinas na defesa vegetal. Lee e colaboradores (2007), por exemplo, isolaram uma ciclofilina de abóbora com atividade antifúngica para *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*.

Sendo a SBTX uma proteína composta por duas cadeias polipeptídicas, esperar-se-ia que fossem encontrados os mesmos perfis de expressão para seus genes codificadores. Contudo, o presente trabalho mostra que, ao longo do desenvolvimento da soja, as expressões relativas de seus genes são diferentes em vários dos tecidos analisados. Todavia, tal fato não se restringe à SBTX. Há vários trabalhos descrevendo a expressão gênica diferenciada de subunidades constituintes de uma única proteína. Gu e colaboradores (2011) relataram a expressão diferenciada de, pelo menos, uma das quatro cadeias constituintes da acetil-CoA carboxilase em folhas e endosperma de pinhão manso ao longo de seu desenvolvimento. Em *Arabidopsis*, foi verificado que os genes codificadores das subunidades da proteína ligante à actina (AtCP - *actin capping protein*), denominados AtCPA e AtCPB, foram expressos em vários tecidos vegetais, contudo, exibiram padrões diferenciados. Os níveis de expressão de AtCPA em caules e folhas foram maiores do que em raízes e flores, enquanto que níveis mais elevados de AtCPB foram detectados em raízes, seguidas de flores, caules e folhas (WANG *et*



*al.*, 2012b). Similarmente, em batata (*Solanum tuberosum*), as subunidades constituintes do complexo da celulose sintase foram expressas de forma diferenciada em diferentes tecidos (OBEMBE *et al.*, 2009). Os transcritos das quatro subunidades tiveram seus níveis de expressão quantificados por qRT-PCR e foi verificado que, de forma geral, aquele associado à subunidade CesA3 se mostrou mais abundante do que os das outras subunidades.

No mesmo plantio, ainda foram coletadas sementes nos períodos de 15, 25 e 35 dias após a antese (DAA), os quais se referem, respectivamente, às fases: morfogênica tardia (até duas semanas após o florescimento); de divisão celular (de 3 a 4 semanas após o florescimento) e à fase de expansão celular (5 a 6 semanas após o florescimento) (MEINKE; CHEN; BEACHY, 1981), buscando informações sobre o perfil de expressão dos genes codificadores da SBTX durante o enchimento do grão. Transcritos referentes à subunidade de 17 kDa da SBTX foram detectados ao longo do desenvolvimento da semente de soja sem muitas variações, havendo, portanto, um leve aumento na semente madura (FIGURA 17). Esse comportamento sugere a importância dessa cadeia polipeptídica nos processos envolvidos na formação da semente, compreendendo a síntese de proteínas relacionadas às diversas vias metabólicas. Hajduch *et al.* (2005) apresentaram um estudo sistemático de mais de 600 proteínas expressas durante quatro etapas fundamentais do desenvolvimento da semente de soja. Os autores observaram que, com o desenvolvimento da semente, proteínas de reserva e proteínas envolvidas na produção de energia tiveram suas sínteses aumentada, ao passo que aquelas relacionadas ao crescimento e divisão celular e ao metabolismo sofreram decréscimo. Quanto às proteínas relacionadas à defesa, abundância foi verificada na fase inicial de enchimento do grão, decrescendo no fim da fase de divisão celular (28 dias após a antese - 28 DAA) e se mantendo estável nas fases posteriores. Isso mostra o envolvimento de uma diversidade de proteínas nas várias etapas de formação da semente madura. Entre elas, as proteínas *ciclofilinas-like*, por exemplo, poderiam ser necessárias, assim como as ciclofilinas clássicas, que são importantes nos processos de ligação, montagem e dobramento de moléculas recém-sintetizadas nas sementes (WU; WENSLEY; BHAVE, 2009). Em relação aos transcritos do gene *SBTX27* no processo de enchimento do grão, a partir de 15 DAA houve aumento na expressão, o qual foi mantido até 35 DAA, atingindo nível máximo na semente madura (FIGURA 18). Padrão semelhante foi verificado no trigo, no qual proteínas envolvidas na defesa se mostraram mais abundantes em sementes maduras do que no início de seu desenvolvimento (VENSEL *et al.*, 2005). Ainda com trigo, *PR4* apresentou perfil de expressão de transcrito similar ao descrito para *SBTX27*, tendo sido ambos os genes mais expressos em fases tardias do processo de formação da semente (ALTENBACH *et al.*, 2007).

No entanto, ainda que os padrões de expressão dos genes *PR4* e *SBTX27* tenham sido semelhantes, nesse último caso, as taxas de transcritos foram bem maiores, atingindo um valor de expressão relativa cerca de 10 vezes maior do que o encontrado para *PR4*.

Níveis elevados de transcritos das subunidades de 17 kDa e 27 kDa da SBTX nas sementes maduras de soja fazem sentido, visto que, em geral, as sementes são ricas em nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, tornando-se, portanto passíveis de ataques por patógenos e herbívoros. Assim, é bastante razoável a proposição de que no arsenal proteico das sementes existem moléculas capazes de lhes conferir resistência até o estabelecimento da plântula. Nesse contexto, vários trabalhos trazem em seu escopo a presença constitutiva de proteínas relacionadas à defesa durante o desenvolvimento de sementes, como descrito para as PR2 e PR3 em tomate, tabaco e ervilha (MOROHASHI; MATSUSHIMA, 2000; WU *et al.*, 2001; LEUBNER-METZGER, 2005), PR3 e PR4 em cenoura (KRAGH *et al.*, 1996) e lipoxigenases em soja (HILDEBRAND; VERSLUYS; COLLINS, 1991).

Visto que transcritos da SBTX foram detectados em níveis elevados nos cotilédones e, principalmente, que essa proteína foi purificada de sementes maduras (FIGURA 06), procurou-se identificar em que região desse órgão estaria localizada essa proteína. Para isso, recorreu-se à técnica de imunohistoquímica, usando sementes maduras de soja e IgG anti-SBTX produzida em coelho. De forma singular, SBTX foi encontrada na epiderme (FIGURA 32), uma localização compatível com o papel de defesa proposto para essa proteína, visto se tratar de uma região representando a primeira barreira que o patógeno encontra ao tentar adentrar no cotilédone. Em folhas, relata-se que as proteínas relacionadas à defesa, de forma geral, encontram-se de forma constitutiva tanto na epiderme, como em células do mesófilo (van LOON; REP; PIETERSE, 2006). Quanto à presença de proteínas de defesa em cotilédones, Santos *et al.* (2004) localizaram uma quitinase por toda extensão desse tecido em sementes de *Adenanthera pavonina* que, inclusive, era exsudada para o meio. A presença de SBTX também foi verificada em exsudatos de sementes de soja (ROCHA, 2011), sugerindo a participação dessa proteína no processo da germinação, atuando, talvez, na proteção da semente contra o ataque de patógenos.

Embora haja várias evidências a favor da proposição de que defesa é a principal função da SBTX, uma das propriedades intrínsecas a muitas proteínas de defesa é sua indução perante desafios abióticos e/ou bióticos. Assim, no presente trabalho, folhas primárias de plantas de soja foram tratadas com ácido salicílico (abiótico) ou com o fungo *C. kikuchii* (biótico) e a expressão de transcritos dos genes *SBTX17* e *SBTX27* analisados. A escolha

desse fungo foi embasada nas grandes perdas na produção causadas por ele, não apenas em culturas de soja, mas, também, em outras culturas de importância agrônômica no mundo (PELEGRINI *et al.*, 2006; EMBRAPA, 2010).

Na análise dos efeitos dos estresses em plantas de soja causados pelo *C. kikuchii* e ácido salicílico sobre a expressão dos genes *SBTX17* e *SBTX27*, o gene da quitinase tipo 1 (*PR3*) foi usado como marcador de resposta de indução de defesa em folhas, cuja escolha se deu em decorrência de dados obtidos previamente (UPCHURCH; RAMIREZ, 2010). Na análise precedente, plantas de soja infectadas com o fungo *C. kikuchii* apresentaram níveis aumentados de transcritos do gene *PR3*, em comparação àquelas não infectadas, indução essa detectada 12 horas após inoculação. Apesar da espécie vegetal e do fungo terem sido os mesmos, o perfil de expressão de *PR3* no presente trabalho diferiu um pouco do que foi verificado anteriormente, pois, embora tenha havido um aumento na taxa de transcritos 12 horas após a inoculação com *C. kikuchii*, a expressão máxima ocorreu apenas 48 horas depois do desafio da soja pelo fungo (FIGURA 26). Isso, de forma alguma, inviabiliza o uso do gene *PR3* como marcador molecular de resposta defesa. Vega-Sánchez *et al.* (2005) avaliaram o perfil de expressão de sete proteínas de defesa em cotilédones e raízes de 14 cultivares de soja e verificaram que cada gene foi expresso de forma singular em cada cultivar. Isso mostra que uma espécie pode apresentar diferentes perfis de expressão gênica quando se analisa cultivares distintas, justificando, assim, as diferenças aqui relatadas no padrão de expressão do gene *PR3* em folhas de soja submetidas ao tratamento com elicitores.

Ainda em relação ao uso do gene *PR3* como marcador na análise de resposta de defesa induzida, a sua expressão em vias decorrentes da sinalização pelo ácido jasmônico já é bem conhecida (THOMMA *et al.*, 1998). Todavia, nesse trabalho, um aumento da expressão de *PR3* ocorreu em consequência do tratamento de folhas primárias de soja com ácido salicílico (FIGURA 26). Há vários estudos mostrando que esses dois elicitores podem atuar de forma sinérgica induzindo a expressão de proteínas de defesa. Isso foi observado para uma *PR1* em plantas de *Arabidopsis* (MUR *et al.*, 2006) e, também, para as *PRs* 1, 2 e 10 e quitinases em frutos de banana (TANG *et al.*, 2013).

Os níveis de transcritos de *SBTX17* e *SBTX27* em folhas primárias desafiadas pelo fungo *C. kikuchii* aumentaram, revelando indução de ambos os genes codificadores dessa proteína (FIGURA 26). Os perfis de expressão dos transcritos desses dois genes foram similares. A indução na transcrição foi verificada principalmente 6 e 12 horas após o início do tratamento, ocorrendo, em seguida, uma leve queda na taxa de transcritos, tendo esse decréscimo se acentuado no tempo de 48 horas. Godoy *et al.* (2000) encontraram perfil de

expressão parecido para uma ciclofilina (*StCyp*), em tubérculos de batata infectados pelo fungo *F. solani* f. sp. *eumartii*, particularmente no que diz respeito ao tempo necessário para observar a indução do gene *StCyp*, que foi de 14 horas após a infecção. Todavia, essa indução se manteve até 72 horas após o início da inoculação do fungo. Em situações de estresses, é sugerido que ciclofilinas podem desempenhar importante papel na transdução de sinais durante o processo de dobramento e montagem de proteínas, atuando como chaperonas, na tentativa de diminuir os riscos de degradação proteolítica e/ou evitar agregação (KONG; LEE; HWANG, 2001).

Outro trabalho realizado com folhas de soja inoculadas com *C. kikuchii* revelou a indução de 14 genes codificadores de proteínas envolvidas na defesa vegetal, incluindo seis classes de PR-proteínas. Todavia, a indução da maior parte dos transcritos iniciou 24 horas após a inoculação das plantas com o fungo (UPCHURCH; RAMIREZ, 2010). Adicionalmente, foi observada a indução de genes de PR-proteínas, das classes 3, 5 e 8, em plantas de trigo infectadas com o fungo *Fusarium graminearum*, porém isso foi evidenciado apenas 36 horas após inoculação do fitopatógeno (Wu *et al.*, 2014). Nos casos citados acima, foram necessários maiores intervalos de tempo para manifestação da indução gênica do que os verificados com os genes *SBTX17* e *SBTX27*. Essa resposta mais recente é de relevância na interação planta x patógeno, já que a velocidade de reconhecimento do agressor por parte do vegetal e seu tempo de resposta à invasão determinam o sucesso da resistência da planta contra o fitopatógeno (STINTZ *et al.*, 1993).

Após o reconhecimento da invasão de um patógeno, as plantas respondem através da indução de complexas respostas de defesa, participando ativamente deste processo os fitormônios. Estas moléculas transmitem o sinal de ameaça através de uma rede de sinalização interconectada, culminando na expressão de genes relacionados à defesa (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2014). Dessa forma, com o intuito de saber se transcritos dos genes *SBTX17* e *SBTX27* seriam responsivos a elicitores de defesa, folhas primárias de soja foram também tratadas com ácido salicílico 5 mM. Ambos os genes codificadores da SBTX foram responsivos ao tratamento com esse fitormônio, porém os perfis de expressão de seus transcritos foram diferentes (FIGURA 26). O tempo de indução do gene *SBTX17* foi maior e seus transcritos apresentaram valores de expressão relativa mais baixos em comparação ao gene *SBTX27*. O perfil de expressão de transcritos de *SBTX17* assemelha-se com o do gene da ciclofilina *ScCyp*, o qual apresentou indução máxima após 24 horas de tratamento de folhas de *Solanum commersonii* com ácido salicílico (MEZA-ZEPEDA *et al.*, 1998). Da mesma forma, aumento

de transcritos do gene de uma PR10 foi observado em folhas de *Lithospermum erythrorhizon*, 24 horas após o tratamento com ácido salicílico.

A indução dos genes da SBTX por elicitores de defesa suscita a ideia de que essa proteína poderia tratar-se de uma nova classe dentro das PR-proteínas. Esse fato somado à presença constitutiva e ubíqua dos genes da SBTX ao longo do desenvolvimento da planta e, ainda, às propriedades antifúngicas da SBTX e sua localização na superfície tecidual elencam os genes codificadores desta proteína como candidatos promissores à produção de soja transgênica resistente ao ataque de fungos de relevância agronômica.

## 8 CONCLUSÕES

A presença constitutiva e ubíqua de transcritos dos genes codificadores (*SBTX27* e *SBTX17*) da toxina da soja (SBTX) em tecidos vegetativos e reprodutivos da soja foi verificada, predominando nos cotilédones e folhas unifolioladas, nos estádios iniciais de seu desenvolvimento. Nos cotilédones, SBTX está depositada na sua superfície, de forma mais precisa na epiderme. Indução da expressão de ambos os genes da SBTX foi ainda observada em folhas primárias de plantas de soja desafiadas com o fungo *C. kikuchii* ou tratadas com ácido salicílico, tendo essa resposta positiva se manifestado dentro das primeiras 24 horas após o tratamento. Em todas as condições aqui analisadas, os genes codificadores da SBTX apresentaram expressão diferencial, prevalecendo transcritos do gene *SBTX27* em relação ao *SBTX17*. Tais resultados contribuem para validação do papel de defesa atribuído à SBTX.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEM, C. N.; DASHIELL, K. E. Effect of planting date on severity of frogeye leaf spot and grain yield of soybeans. **Crop Protection**, New York, v. 8, n. 13, p. 607-610, dez. 1994.

ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Doenças da Soja. **In: Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 1. ed. São Paulo: Ceres, 2005. 704 p.

ALTENBACH, S. B. *et al.* Genes encoding the PR-4 protein wheatwin are developmentally regulated in wheat grains and respond to high temperatures during grainfill. **Plant Science**, Limerick, v. 173, n. 2, p. 135-143, abr. 2007.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. 2.ed. Minas Gerais : Viçosa, 2006. p.399-412.

ASAKURA, T. *et al.* Global gene expression profiles in developing soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 52, p. 147-153, mar. 2012.

ATTARAN, E.; HE, S. Y. The long-sought-after salicylic acid receptors. **Molecular Plant**, Shanghai, v.5, p. 971-973, jan. 2012.

BALESTRASSE, K. B. *et al.* The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. **Phytochemistry**, New York, v. 71, n 17-18, p. 2038–2045, dez. 2010.

BERTHOLDO-VARGAS, L. R. *et al.* Type 1 ribosome-inactivating proteins—Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, New York, v. 55, n. 1, p. 51-58, jan. 2009.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, abr. 1987.

BOARD, J. E. **A comprehensive survey of international soybean research- genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2012. 613 p.

BOLLER, T., FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 379-406, jun. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, jan.1976.

BURTON, J. W. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, New York, v. 53, p. 171 - 186, mai. 1997.

CÂMARA, G.M.S. Introdução ao agronegócio da cana. *In: Cana-de-açúcar, mandioca e soja, Departamento de Produção Vegetal*, Piracicaba, p. 1-28, 2011. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lpv/lpv584/584%20Soja%2001%20->

%20Apostila%20Texto%20%20Agronegocio%20Soja%202011.pdf> Acesso em: 18 jan. 2015.

CAPELLARI - JÚNIOR, L.; RODRIGUES, R.R.; SOUSA, V.C. **Apostila de Botânica Sistemática**. 1. ed. Piracicaba: Departamento de Botânica, ESALQ/USP, 1999, 95 p.

CAPLAN, J., PADMANABHAN, M., DINESH-KUMAR, S.P. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 3, p. 126–135, mar. 2008.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n.11, p. 1515-1539, nov. 2002.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 667-676, mar. 1981.

CARLINI, C.R. *et al.* Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, n. 90: 340-348, abr. 1997.

CARNIEL, L. A.; MENOSSO, R.; BALBINOT-JUNIOR, A. A. Reação de cultivares de soja às doenças de final de ciclo com e sem aplicação de fungicidas. **Unoesc & Ciência - ACET**, Joaçaba, v. 5, n. 1, p. 83-90, jan/jun. 2014.

CARVALHO, A. S. *et al.* Purification, Characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia Leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, Colorado, in Press, fev. 2015.

CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, New York, v. 30. p. 1007-1020, mai. 2009.

CASASSOLA, A. *et al.* Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 89, p. 49-54, jan. 2015.

COMETTI, N. N. *et al.* **Soluções nutritivas: formulação e aplicações**. 1 ed. Viçosa: SBCS, 2006, 432 p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da agropecuária. **Boletim**, Brasília, n. 6, p. 12, 2008. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 12 de Jan. 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grão. **Décimo segundo levantamento**, Brasília, v. 2, n. 4, jan. 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos. **Quarto levantamento**, Brasília, v. 1, n. 12, set. 2014.



COSTA, J. H. *et al.* Stress-induced co- Expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 167, p. 561–570, abr. 2010.

DAGUERRE, Y. *et al.* Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soilborne pathogens: a review. **Fungal Biology Reviews**, Manchester, v. 28, n. 4, p. 97-125, dez. 2014.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 539-548, ago. 2010.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja em números (safra 2009/2010). **Embrapa Soja**. Brasília. 2010. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=294&cod\\_pai=17](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17)>. Acesso em: 4 jan. 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias para a produção de soja – Região Central do Brasil** 2009. Londrina: EMBRAPA SOJA. 2009b. 239p.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stages on soybean development. **Iowa State University of Science and Technology**, Ames, sr. 80, p. 11, mar. 1977.

FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Comparativo entre as safras 2013/2014 e 2023/2024 – Projeções de 10 anos. São Paulo. 2013. Disponível em <<http://www.fiesp.com.br/noticias/outlook-fiesp-brasil-deve-ganhar-mercado-nas-exportacoes-de-soja-acucar-carne-suina-e-de-frango-na-proxima-decada/>> Acesso: em 03 fev. 2015.

FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Safra mundial de soja 2014/2015. **10º Levantamento do USDA**, São Paulo, 2015. Disponível em <<http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/>> Acesso em: 03 fev. 2015.

FINGER-TEIXEIRA, A. *et al.* Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 8, p. 1959-1964, nov. 2010.

FU, Z.Q. *et al.* NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, London, v.486, p. 228–232, mai. 2012.

FU, Z.Q., DONG, X.N. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839–863, jan. 2013.

GASSER, C. S. *et al.* Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington D. C., v. 87, n. 34, p. 9519-9523, dez. 1990.

GAVIOLI, E. A. **Explanations for the rise of soybean in Brazil**. In: A comprehensive survey of international soybean research- genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships. 1. ed. Rijeka: InTech, 2012. cap 16, p. 341-366.

GODOY, A.V. *et al.* Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. **Plant Science**, Limerick, v. 152, n. 2, p. 123-134, mar. 2000.

GODOY, C. V.; MEYER M. C. Resistência a fungicidas na cultura da soja. **Embrapa Soja**, Brasília. 2014. Disponível em: <  
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108972/1/Resist-encia-a-fu-ngici-das-na.pdf>> Acesso em: 18 jan. 2015.

GOMEZ-GOMEZ, L.; FELIX, G.; BOLLER, T. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 277-284, may. 1999.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; PELEGRINI, P. B.; FRAGOSO, R. R. Genetically modified soybean for insect-pests and disease control. In: **SUDARIC, A. Soybean – molecular aspects of breeding**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2011.

GU, K. *et al.* Molecular cloning and expression of heteromeric ACCase subunit genes from *Jatropha curcas*. **Plant Science**, Limerick, v. 180, n. 4, p.642-649, abr. 2011.

HAJDUCH, M. A. Systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **Plant Physiology**, Lancaster, v.137, n.4, p. 1397-1419, abr. 2005.

HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from Plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1701, n. 1-2, p. 1-14, out. 2004.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 601-613, abr. 1999.

HILDEBRAND, D. F.; VERSLUYS, R. T.; COLLINS, G. B. Changes in lipooxygenase isozyme levels during soybean embryo development. **Plant Science**, Limerick, v.75, n.1, p.1-8, dez. 1991.

HILL, J. E.; BREIDENBACH, R. W. Proteins of soybean seeds: II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. **Plant Physiology**, Lancaster, v.53, n.5, p.747-751, mai. 1974.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, University of California, 1950, 347-439 p.

HU, R. *et al.* Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time qRT-PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10,n 93, p. 1-12, set. 2009.

- JAMALA, F.*et al.* Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 50, p. 311-316, jan. 2015.
- JONES, S. I.; VODKIN, L. O. Using RNA-seq to profile soybean seed development from fertilization to maturity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-12, mar. 2013.
- JONES, S. I.; GONZALEZ, D. O.; VODKIN, L. O. Flux of transcript patterns during soybean seed development. **BMC Genomics**, London, v.11, p.136-151, fev. 2010.
- KLIEBENSTEIN, D. J. Orchestration of plant defense systems: genes to population. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 250-255, jan. 2014.
- KONG, H. Y.; LEE, S. C.; HWANG, B. K. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 4, p. 189-199, out. 2001.
- KRAGH, K.M. *et al.* Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant ts 11. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.31, n.3, p.631-645, jun. 1996.
- KREYCI, P. F., MENTEN, J. O. M. Limitadoras de produtividade. **Cultivar Grandes Culturas**, São Paulo, v. 3, n. 167, abr. 2013.
- KUBOTA, M.; SHIMITSU, H. Nutrition and bone health. Soybean and soy foods, and bone health. **Clinical Calcium Journal**, Japan, v. 19, n. 10, p. 1514-1519, out. 2009.
- KUMAR, D. Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 228, p. 127-134, nov. 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 679-685, ago. 1970.
- LAPOLA, D. M.; SCHALDACH, R.; ALCAMO, J. Impacts of climate change and the end of deforestation on land use in the Brazilian legal amazon. **Earth Interactions**, New York, v. 15, p. 1-29, mai. 2011.
- LE, B. H. *et al.* Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington D. C., v. 107, n. 18, p. 8063-8070, mar. 2010.
- LEE, H.I., LEON, J., RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington D. C, v. 92, n. 10, p. 4076-4079, mai. 1995.
- LEE, J. R. *et al.* Molecular and functional characterization of a cyclophilin with antifungal activity from Chinese cabbage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, p. 672-678, fev. 2007.

- LEUBNER-METZGER, G.  $\beta$ -1,3-glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. **Plant Journal**, Oxford, v.41, n.1, p.133-145, jan. 2005.
- LIENER, I. E. The intraperitoneal toxicity of concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, n.1, p.183-191, jun. 1951
- LIU, K. S. **Food use of whole soybeans. Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. Urbana: American Oil Chemists' Society Press; 2008. p. 441–482.
- MA, S. *et al.* Expression stabilities of candidate reference genes for rt-qpcr under different stress conditions in soybean. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-7, out. 2013.
- MARIVET, J.; FREND, P.; BURKARD, G. DNA sequence analysis of a cyclophilin gene from maize: developmental expression and regulation by salicylic acid. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 247, n. 2, p. 222-228, abr. 1995.
- MARRA, B. M. *et al.* Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots. **Peptides**, New York, v. 30, n. 5, p. 825-831, mai. 2009.
- MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n.15, p. 2471-2472, out. 2004.
- MARTY, I. *et al.* Growth related gene expression in *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts. **Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 265-278, ago. 1993.
- MEZA-ZEPEDA, L. A. *et al.* Isolation and characterization of a cDNA corresponding to a stress-activated cyclophilin gene in *Solanum commersonii*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 49, n. 325, p. 1451-1452, ago. 1998.
- MEINKE, D. W.; CHEN, J.; BEACHY, R. N. Expression of storage-protein genes during soybean seed development. **Planta**, Berlin, v.153, n.2, p.130–139, out. 1981.
- MONAGHAN, J., ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 349-357, ago. 2012.
- MORAIS, J. K. S. **Aspectos estruturais da toxina da soja (SBTX) e sua participação na defesa vegetal**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- MORAIS, J. K. S. *et al.* Soybean Toxin (SBTX) impairs fungal growth by interfering with molecular transport, carbohydrate/ amino acid metabolism and drug/stress responses. Plos one. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-9, jul. 2013
- MORAIS, J.K.S. **Potencial biotecnológico da Toxina da Soja (SBTX) como uma ferramenta contra fungos**. 2010. p.172. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MORAIS, V.D. **Avaliação da expressão gênica da Toxina da Soja (SBTX) por indutores da defesa de plantas**. 2012. p.95. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of  $\beta$ -1, 3-glucanase activity in germinated tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 51, n. 349, p.1381-1387, ago. 2000.

MUR, L. A. J. *et al.* The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 140, n. 1, p. 249-262, jan. 2006.

NOURI, M. Z.; TOORCHI, M.; KOMATSU, S. Proteomics Approach for Identifying Abiotic Stress Responsive Proteins in Soybean. **In: Soybean Molecular Aspects of Breeding**. 1. ed. Rijeka: InTech, p. 187–214, 2011.

NOVÁKOVÁ, M. *et al.* Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* e Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 80, p. 308-317, mai. 2014.

NOZU, Y.; TSUGITA, A.; KAMIJO, K. Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. **Proteomics**, Weinheim, v.6, n.12, p.3665–3670, jun. 2006.

OBEMBE, O.O. *et al.* Differential expression of cellulose synthase (CesA) gene transcripts in potato as revealed by QRT-PCR. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 47, p.116-118, jul. 2009.

OLIVEIRA, H.D. *et al.* *Gm-TX*, a new toxic protein from soybean (*Glycine max*) seeds with potential for controlling insect pests. **Process Biochemistry**, London, v. 45, n. 5, p.634-640, mai. 2010.

OMAFRA. Diseases of Field Crops: Soybean Diseases. 2009. Disponível em: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/pub811/14soybean.htm>> Acesso em 4 Jan. 2015.

PÁEZ-VALENCIA, J. *et al.* Localization of the MADS domain transcriptional factor NMH7 during seed, seedling and nodule development of *Medicago sativa*. **Plant Science**, Limerick, v. 175, n. 4, p. 596-603, out. 2008.

PANDOLFI, C.; MANCUSO, S.; SHABALA, S. Physiology of acclimation to salinity stress in pea (*Pisum sativum*). **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 84, p. 44–51, dez. 2012.

PELEGRINI, P. B. *et al.* An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S-albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1764, n. 6, p. 1141-1146, jun. 2006.

PENG, D. *et al.* Protein elicitor PemG1 from *Magnaporthe grisea* induces systemic acquired resistance (SAR) in plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 24, p. 1239-1246, out. 2011.

PIETERSE, C.M.J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Reviews of Cell Developmental Biology**, San Francisco, v. 28, p. 489–521, mai. 2012.

RAVEN, P.H. **Biologia Vegetal**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 515-524 p.

RIOS, F.J.B. *et al.* Digestibility of plant lectins from Canavalia, Cratylia, Dioclea and *Artocarpus* genera. In: **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. 1. ed. Berlin: Hardcover, v. 11, p. 277–284. 1996.

RIVAS-SAN VICENTE, M., PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 3321–3338, fev. 2011.

ROBERTS, R.C.; BRIGGS, D.R. Isolation and characterization of the 7S component of soybean globulins. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 42, n. 1, p. 71–85, jul. 1965.

ROCHA, R. O. **Prospecção de proteínas exsudadas por sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com potencial biotecnológico na defesa contra patógenos de solo**. p. 84. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 2011

RODRIGUES, M.A.T. **Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura da soja**. p.198. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Produção Vegetal e Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ROY, K.W.; BAIRD, R.E.; ABNEY, T.S. A Review of Soybean (*Glycine max*) Seed, Pod, and Flower Mycofloras in North America, with Methods and a Key for Identification of Selected Fungi. **Mycopathologia**, The Hague, v.150, n.1, p15–27, jan. 2001.

RUSHTON, P.J., *et al.* WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, Cambridge. v. 15, p. 247–258, mai. 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New Your: Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANTOS, I. S. *et al.* A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 1203–1210, dez. 2004.

SARAIVA, K. D. C. *et al.* Selection of suitable soybean EF1a genes as internal controls for real-time PCR analyses of tissues during plant development and under stress conditions. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 33, p. 1453-1465, set. 2014.

SHAH, D. M. *et al* Resistance to diseases and insect in transgenic plants: progress and applications to agriculture. **Trends in Biotechnology**, Amserdam, v. 13, p. 362 – 368, set. 1995.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. History of soybeans and soyfoods in South america (1882-2009): extensively annotated bibliography and sourcebook. **Soyinfo Center**, Lafayette, p. 6-

625, abr. 2009. Disponível em: < [www.soyinfocenter.com/pdf/132/LaSo.pdf](http://www.soyinfocenter.com/pdf/132/LaSo.pdf)> Acessado em: 18 fev. 2015.

SIEBRA, E. A. SBTX, Uma Nova Toxina Protéica das Sementes de Soja [*Glycine max* (L.) merr.] cv. BR-10. Isolamento e Caracterização. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ce, 109 p. 1998.

SIEBRA, E.A. **Toxina da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: aspectos bioquímicos e seu provável papel na defesa da planta**. p.148. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

STANISÇUASKI, F. *et al.* Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, Oxford, n. 45: 753–760, mai. 2005.

STINTZI, A. *et al.* Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, p. 687-706, ago. 1993.

STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful Proteins. **Toxicon**, Oxford, v. 67, p. 12-16, jun. 2013.

TADA, Y. *et al.* Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins, **Science**, New York, v. 321, p. 952–956, jul. 2008.

TANG, Y. *et al.* Molecular characterization of PR and WRKY genes during SA- and MeJA-induced resistance against *Colletotrichum musae* in banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Washington, v. 79, p. 62-68, fev. 2013.

TECNOLOGIAS de produção de soja - região central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, n. 15, p. 261. 2011.

THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. Heterogeneity of beta-conglycinin. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 181, n. 2, p. 404–409, ago. 1976.

THOMMA, B.P. *et al.* Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington D. C., v. 95, p. 15107–15111, dez. 1998.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, set. 1979.

USDA - United States Agriculture Department. Safra mundial de soja 2014/2015. **Décimo levantamento**, Washington, v. 2, n. 3, fev. 2015.

UPCHURCH, R. G.; RAMIREZ, M. E. Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, p. 1 – 7, dez. 2010.

van LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, mar. 2006.

VARELA, A. L. N. **Ação de galactomanana sulfatada isolada de *Adenanthera pavonina* na resposta bioquímica de defesa do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) desafiado pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

VASCONCELOS, I. M. *et al.* SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, Oxford, v. 51, p. 952–956, mai. 2008.

VASCONCELOS, I.M. *et al.* Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysic**, New York, v.312, n.2, p.357-366, Ago. 1994.

VEGA-SÁNCHEZ, M.E. *et al.* Spatial and temporal expression analysis of defense-related genes in soybean cultivars with different levels of partial resistance to *Phytophthora sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.66, p.175-182, mai. 2005.

VENSEL, W. H. *et al.* Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 1594–1611, abr. 2005.

WANG, G. *et al.* A Transcriptional Roadmap for Seed Development in Maize. **In: Seed Development: OMICS Technologies toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield**. 1. ed. New York: Springer, 2012a. cap. 5, p. 81-97.

WANG, J. *et al.* *Arabidopsis* actin capping protein (AtCP) subunits have different expression patterns, and downregulation of *AtCPB* confers increased thermotolerance of *Arabidopsis* after heat shock stress. **Plant Science**, Limerick, v. 193-194, p. 110-119, set. 2012b.

WASTERNAK, C. Action of jasmonates in plant stress responses and development: applied aspects. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 32, p. 31–39, jan. 2014.

WILDERMUTH, M.C. *et al.* Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, London, v. 144, p. 562-565, nov. 2001.

WU, C-T. *et al.* Class I  $\beta$ -1,3-Glucanase and Chitinase Are Expressed in the Micropylar Endosperm of Tomato Seeds Prior to Radicle Emergence. **Plant Physiology**, Lancaster, v.126, n.3, p.1299-1313, Jul. 2001.

WU, H.; WENSLEY, E.; BHAVE, M. Identification and analysis of genes encoding a novel ER-localised Cyclophilin B in wheat potentially involved in storage protein folding. **Plant Science**, Limerick, v. 176, p. 420–432, mar. 2009.



- WU, S. *et al.* Response to Infection/Infestation by *Fusarium*, *Yellow dwarf virus* (YDV) Aphid-Transmitted and Hessian Fly. **Journal of Integrative Agriculture**, Amsterdam, v. 13, p. 926-936, mai. 2014.
- XIN, X.F., HE, S.Y. *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 473–498, mai. 2013.
- XUE, L. J.; ZHANG J. J.; XUE H. W. Genome-Wide Analysis of the Complex Transcriptional Networks of Rice Developing Seeds. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 1-15, fev. 2012.
- YANG, H.-R. *et al.* Effect of salicylic acid on jasmonic acid-related defense response of pea seedlings to wounding. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, p. 166–173, abr. 2011.