

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E  
MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE GENES  
EM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTE,  
DURANTE A INTERAÇÃO COM  
*Meloidogyne javanica***

**MARCUS JOSÉ CONCEIÇÃO LOPES**

**2009**

**MARCUS JOSÉ CONCEIÇÃO LOPES**

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E MUDANÇAS NA EXPRESSÃO  
DE GENES EM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTE, DURANTE A  
INTERAÇÃO COM *Meloidogyne javanica***

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do curso de  
Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal,  
para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS –BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Lopes, Marcus José Conceição.

Aspectos histopatológicos e mudanças na expressão de genes em genótipos de soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica* / Marcus José Conceição Lopes. – Lavras : UFLA, 2009.

92 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Nematóide da galha. 2. Glycine max. 3. PI 595099 4. BRSMG 250 Nobreza. 5. Biblioteca cDNA I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.32205249

**MARCUS JOSÉ CONCEIÇÃO LOPES**

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E MUDANÇAS NA EXPRESSÃO  
DE GENES EM GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTE, DURANTE A  
INTERAÇÃO COM *Meloidogyne javanica*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do curso de  
Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal,  
para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 6 de fevereiro de 2009

Profª. Dra. Magnólia de Araújo Campos      UFCG

Dr. Thales Lima Rocha      EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Maria Eugênia Lisei de Sá      Epamig-CTPP

Dr. Marcelo Murad Magalhães      UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS –BRASIL

A Deus, pela vida, saúde e força na realização deste trabalho.

### **Ofereço**

A minha mãe, Alice, meus irmãos, sobrinhos, amigos  
e a amiga Magnólia de Araújo Campos.

### **Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), à Epamig-CTPP e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Fapemig, pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto “Aplicações da Genômica Funcional ao Melhoramento de Soja (*Glycine max* L. Merrill), visando resistência a *Meloidogyne* sp.”, do qual este trabalho é parte substancial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela orientação e concessão de uso do Laboratório de Biologia Molecular Central da UFLA.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos, pelos conselhos, incentivo, conhecimentos transmitidos e exemplo de profissional ética.

À Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, pelo maravilhoso apoio, indispensável para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca, Dr. Thales Lima Rocha, Dra. Maria Eugênia Lisei de Sá e Dr. Marcelo Murad Magalhães, pela ajuda e valiosas sugestões.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas de curso e aos colegas de trabalho, cuja convivência, tornou melhor a realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela convivência e contribuição na realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

MARCUS JOSÉ CONCEIÇÃO LOPES, filho de Alice Paim Conceição e José Conceição Filho, nasceu em 28 de agosto de 1979, no município de Piumhi, estado de Minas Gerais, Brasil.

Em fevereiro de 1999 ingressou no Unicentro Metodista Izabela Hendrix, em Belo Horizonte, MG, e, em maio de 2001, como bolsista de iniciação científica junto à Embrapa Milho e Sorgo, sob orientação da Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza, com atividades de pesquisa na área da fisiologia do estresse, permanecendo até agosto de 2002. Em dezembro de 2002 obteve o título de Licenciado em Biologia e em março do ano seguinte ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), concentrando seus estudos na área de fisiologia do estresse em milho. Foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob a orientação do Prof. Dr. José Donizeti Alves e coorientação de Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza. Em fevereiro de 2005, obteve o título de “Mestre” e, em março do mesmo ano, iniciou o doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, com pesquisas desenvolvidas na área da biologia molecular, sob orientação do Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva e coorientações da Dra. Magnólia de Araújo Campos e da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, sendo bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (Fapemig). Em 6 de fevereiro de 2009, submeteu-se à defesa de Tese, para a obtenção do título de “Doutor”.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	iii
CAPÍTULO 1: Importância do estudo da interação soja- <i>Meloidogyne</i> .....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Importância da sojicultura .....	4
2.2 Nematoses na cultura da soja: o caso das meloidogynoses .....	5
2.3 Medidas de controle de fitonematoides na sojicultura.....	11
2.4 Resistência de soja a nematoides .....	12
2.5 Estudos de expressão gênica envolvendo interação soja-nematoide .....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO 2: Análise histopatológica da resistência ao nematóide da galha em genótipos de soja.....	30
1 RESUMO.....	30
2 ABSTRACT .....	31
3 INTRODUÇÃO .....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.1 Obtenção e preparo de juvenis do segundo estágio (J <sub>2</sub> ) de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	34
4.2 Inoculação de plantas de soja ( <i>Glycine max</i> L.) com <i>M. javanica</i> .....	34
4.3 Análise microscópica da penetração e desenvolvimento de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de soja .....	35
4.4 Avaliação e análise dos dados .....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 Monitoramento da penetração e desenvolvimento do juvenil de <i>M. javanica</i> em raízes de soja.....	36
5.2 Desenvolvimento de <i>M. javanica</i> em raízes de soja resistentes e suscetíveis, após 45 dias da inoculação com J <sub>2</sub> .....	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 3: Mudanças na expressão de genes em soja resistente, durante a interação com <i>Meloidogyne javanica</i> .....	50
1 RESUMO.....	50
2 ABSTRACT .....	52
3 INTRODUÇÃO .....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	55

4.1 Obtenção e preparo de juvenis do segundo estágio (J <sub>2</sub> ) de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	55
4.2 Inoculação de plantas de soja ( <i>Glycine max</i> L.) com <i>M. javanica</i> .....	55
4.3 Isolamento de RNA de raízes de soja infectadas com <i>M. javanica</i> .....	56
4.3.1 Extração de RNA total (Método Trizol).....	56
4.3.2 Limpeza do RNA .....	57
4.4 Construção das bibliotecas de cDNA de raízes de soja inoculada com <i>M. javanica</i> .....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
5.1 Montagem e validação das ESTs .....	61
5.2 Identificação de genes de raízes de soja com significante variação na transcrição durante interação com <i>M. javanica</i> .....	61
5.3 Identificação de genes expressos apenas em raízes de soja durante interação com <i>M. javanica</i> .....	69
5.4 Genes expressos apenas em raízes de soja não inoculadas com <i>M. javanica</i> .....	78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
CONCLUSÕES FINAIS .....	91
PERSPECTIVAS.....	92

## RESUMO

LOPES, Marcus José Conceição. **Aspectos histológicos e mudanças na expressão de genes em genótipos de soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica***. 2009. 92 p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. \*

Tendo em vista a expressiva posição ocupada pelo Brasil de segundo maior produtor de soja, torna-se relevante disponibilizar informações sobre o mecanismo molecular de resistência a doenças. Neste trabalho, estudou-se a resistência da linhagem de soja PI 595099 durante o parasitismo de *Meloidogyne javanica*, por meio de análise histopatológica e mudanças na expressão de genes. O desenvolvimento de juvenis de *Meloidogyne javanica* foi analisado em raízes da linhagem de soja resistente PI 595099, nos períodos de 24, 48, 96, 144 e 192 horas após inoculação (h.a.i), tendo como testemunha a cultivar BRSMG 250 Nobreza. Duas bibliotecas de cDNA foram construídas utilizando-se uma mistura de RNA de raízes de soja resistente, não inoculadas e inoculadas, com 500 juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. javanica*, coletados nos períodos de 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 192 h.a.i. Pelas análises histopatológicas foi observado que, em geral, nos tempos analisados, houve maior penetração de J<sub>2</sub> na cultivar Nobreza. A partir de 144 h.a.i., houve predomínio de juvenis salsichoides (terceiro e ou quarto estádios) no genótipo suscetível e formação de células gigantes as 192 h.a.i. Nesses mesmos períodos, a maioria dos juvenis mostrava-se filiforme (J<sub>2</sub>), porosa e pouco corada no genótipo resistente. A formação de galhas e massas de ovos após 45 dias da inoculação foi maior no genótipo suscetível do que no genótipo resistente. As observações histopatológicas, aliadas à baixa formação de galhas e massas de ovos encontrada na linhagem PI 595099, evidenciam a existência de uma barreira ao pleno desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes desse genótipo. Cerca de 800 *ESTs* (etiquetas de sequências expressas) foram sequenciadas e agrupadas em 195 clusters. Com base em análise de subtração *in silico*, onze genes diferencialmente expressos foram encontrados, os quais, provavelmente, codificam proteínas que compartilham similaridade de sequências de aminoácidos, via Blastx, com proteínas do tipo metalotioneína, proteína reprimida pela auxina (*arp*), SLAH1 (SLAC1 Homologue 1), SLAH4 (SLAC1 Homologue 4), zinc finger,

---

\* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva (UFLA-Orientador), Magnólia de Araújo Campos (UFMG), Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

tiorredoxina, AN1, A20 e fator de transporte nuclear (NTF-2). É provável que todos esses genes estejam envolvidos na resistência da PI 595099 a *M. javanica*. Vários outros genes também foram encontrados somente em raízes de PI 595999 sob condições de estresse pelo nematoide, incluindo N-metiltransferase, glutatona transferase, NADH-ubiquinona oxirredutase, kinesina, chalcona redutase, proteínas MADS-Box, fator de transcrição MYB, proteína contendo o domínio NAC e proteína contendo o domínio SAP, entre outros. Diferentemente, entre os transcritos encontrados em raízes de PI 595099 não inoculadas estão aqueles que codificam proteínas do tipo proteína ser/ter kinase, possível inibidor de protease do tipo tripsina Kunitz, inibidor de protease do tipo cisteína (cistatina), proteína de família responsiva a etileno e proteína do tipo metalotioneína, entre outros, os quais já foram descritos envolvidos na resistência de plantas a ferimento e insetos. Aparentemente, diferentes mecanismos de defesa devem estar atuando antes e depois da presença do nematoide nas raízes do genótipo de soja resistente PI 595099.

## ABSTRACT

LOPES, Marcus José Conceição. **Histopathological aspects and changes in gene expression within resistant soybean genotypes during interaction with *Meloidogyne javanica***. 2009. 92 p. Thesis (Doutorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.\*

In reason of the expressive position occupied by the Brazil as the second largest soybean producer world-wide, to provide molecular information about pest resistant at the soybean resistant phenotypes is very important. Here, we study the resistance by soybean line (PI 595099) during *Meloidogyne javanica* parasitism, by histopathological and molecular approaches. The development of *M. javanica* juveniles was analyzed in roots of the resistant PI 595099 following the time course 24, 48, 96, 144 and 192 hours after the inoculation (h.a.i) and using the susceptible soybean cultivar BRSMG 250 Nobreza as a control. In addition, two cDNA libraries were constructed using a pool of RNA from PI 595099 roots, inoculated and non-inoculated with 500 juveniles of second stage (J<sub>2</sub>) of *M. javanica*, collected at 6, 12, 24, 48, 96, 144 and 192 h.a.i. Histopathological analyzes reveled that, in general, in all the analyzed time points, has occurred higher J<sub>2</sub> penetration in Nobreza cultivar. From 144 h.a.i. there was predominance of swollen juveniles (J<sub>3</sub>/J<sub>4</sub> juveniles) in the susceptible genotype and formation of giant cells at 192 (h.a.i.). In these same periods, the majority of the juveniles showed as filiforms (J<sub>2</sub>), porous and almost colorless in the resistant genotype. The formation of galls and egg masses after 45 days of inoculation was higher in the susceptible genotype than in the resistant one. Taken together histopathological findings, the reduced gall formation and egg masses found in PI 595099 provide evidences that there was a barrier that limited the complete development of *M. javanica* in the roots of this genotype. About 800 ESTs (expressed sequence tags) were sequenced e clustered into 195 clusters. Based on *in silico* subtraction analysis, eleven differentially expressed genes were found encoding putative proteins sharing amino acid sequence similarities by Blastx to metallothionein, SLAH1 (SLAC1 Homologue 1), SLAH4 (SLAC1 Homologue 4), Zinc finger, AN1-type, A20-type, Auxin-repressed protein, Thioredoxin and Nuclear transport factor 2 (NTF-2) proteins. All of them are putatively involved in resistance of the PI 595099 to *M.*

---

\* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva-UFLA (Major professor), Magnólia de Araújo Campos (UFCG), Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

*javanica*. Several other genes were also found in PI 595999 roots only under nematode-stressed conditions, including *NAC domain-containing protein MADS-box protein SOCl (protein suppressor of constans overexpression 1)*, *thioredoxin-like protein 4-Coumarate--CoA ligase*, *Transcription factor MYBZ2*, among others. In a different way, among genes expressed only in non-stressed roots of PI 595099 were found *Ser/Thr protein kinase*, *Wound-induced basic protein*, *Ethylene-responsive family protein*, *Metallothionein-like protein*, *Cysteine proteinase inhibitor (Cystatin)* *Putative Kunitz trypsin protease inhibitor*, all of them described to be involved in wounding and insect plant resistance. Apparently, different defense mechanisms could be acting previously and after nematode presence in roots of the resistant soybean line PI 595099.

## CAPÍTULO 1

### Importância do estudo da interação soja-*Meloidogyne*

#### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L. Merrill) representa divisas para o agronegócio brasileiro, com produção anual aproximada de 60 milhões de toneladas, representando 6,77% das exportações (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, EMBRAPA, 2009; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2009). Entretanto, um dos principais fatores que limitam a produção de soja no Brasil é o ataque por fitonematoides, especialmente do gênero *Heterodera* (nematoides do cisto) e *Meloidogyne* sp. (nematoides da galha) (Almeida et al., 2005).

Dentre os métodos de controle de fitonematoides na cultura de soja estão a rotação de culturas e a utilização de cultivares resistentes (Henning et al., 2005), além do uso de nematicidas e controle biológico. Porém, todos possuem limitações. Dessa forma, considerando-se a importância da cultura da soja em si e dos danos causados por nematoides, especialmente *M. javanica*, aliada à falta de medidas de controle, tornam-se fundamentais os estudos da interação fitonematoides-soja.

Com o surgimento do nematoide do cisto da soja, ou NCS, no início dos anos 1990, por algum tempo, as atenções estiveram voltadas aos estudos com tal espécie. Mas já se verifica, atualmente, que as pesquisas sobre os nematoides de galhas voltam a ocupar lugar de destaque (Ferraz, 2001).

A linhagem de soja PI 595099 apresenta resistência a *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Silva et al., 2002) e vem sendo utilizada em programas

de melhoramento de soja visando resistência a pragas (Hesler et al., 2007). No entanto, os mecanismos que conferem essa resistência ainda não foram totalmente elucidados. Essa elucidação poderá contribuir para o melhor entendimento da relação soja-*Meloidogyne*, a exploração sustentável da resistência, o estabelecimento de genes candidatos a programas de melhoramento de soja, bem como para a aplicação em transgenia.

Neste contexto, o estudo de genes expressos diferencialmente oferece a possibilidade de prospectar, a partir de bibliotecas de cDNA, vários genes envolvidos nas condições de interesse.

Em hipótese, a PI 595099 possui alta resistência aos nematoides de galhas. Por isso, provavelmente, limita a reprodução desses fitonematoides em suas raízes, com um menor número de juvenis penetrados, formação de galhas e massas de ovos. Ainda, deve possuir alterações na expressão de genes, ligados a sua resistência, quando em contato com fitonematoides, na tentativa de frear o desenvolvimento desses juvenis dentro da raiz.

Em virtude da escassez de informação sobre a base molecular de genótipos observados como resistentes, neste trabalho objetivou-se estudar a resistência da linhagem de soja (PI 595099) durante o parasitismo de *Meloidogyne javanica*, por meio de análise histopatológica (tendo como controle, a cultivar de soja BRSMG 250 Nobreza) e mudanças na expressão de genes por meio da construção de bibliotecas de cDNA de raízes. A estratégia de ação empregada envolveu: i. a realização de bioensaios de inoculação de *M. javanica* em genótipos de soja resistente (PI 595099) e suscetível (Nobreza); ii. análises histopatológica e quantitativa da penetração de juvenis de segundo estágio e formação de galhas e massas de ovos após 45 dias de inoculação desses juvenis nos genótipos resistente e suscetível; iii. construção de bibliotecas de cDNA de raízes na linhagem de soja resistente inoculadas e não inoculadas com *M. javanica*; iv. construção de bancos de etiquetas de sequências expressas

(EST) para a soja e v. análise dos genes diferencialmente expressos por subtração *in silico*, utilizando ferramentas da bioinformática.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância da sojicultura**

A cultura da soja é extremamente importante para o agronegócio brasileiro, representando 6,77% das exportações brasileiras, movimentando 9,3 bilhões de dólares (Embrapa, 2009; Conab, 2009). O cultivo da soja foi introduzido no Brasil no final do século XIX, no estado da Bahia (Medina, 1981). A produção de soja, antes da década de 1970, no estado de Minas Gerais, era pouco expressiva e, a partir desta década, houve um incremento expressivo a cada ano, tendo grande expansão na região do Triângulo Mineiro (Sediyama et al., 1981).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos, com produção de, aproximadamente, 60 milhões de toneladas. O estado do Mato Grosso o maior produtor nacional (CONAB, 2009).

A soja pertence à família Fabacea, é uma planta tipicamente herbácea, que apresenta grande diversificação genética e morfológica devido ao elevado número de variedades e cultivares. Essa diversidade de formas ainda pode ser maior, devido a fatores ambientais que podem alterar a expressão genética produzindo diferentes fenótipos. Como planta anual, seu desenvolvimento é bastante rápido, necessitando, desde a germinação até a completa maturação, de 75 dias para as variedades precoces e até 200 dias para tardias (Muller, 1981).

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana, entra na composição de vários produtos embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo, também é produzida a lecitina, um agente emulsificante, muito usada na

fabricação de salsichas, maioneses e achocolatados. Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível, o biodiesel (Embrapa, 2009).

## **2.2 Nematoses na cultura da soja: o caso das meloidogynoses**

Dentre as principais doenças da soja, aquelas causadas por nematoides merecem destaque. As principais nematoses da soja são causadas pelos nematoides do cisto da soja (gênero *Heterodera*) e nematoides da galha (Gênero *Meloidogyne*) (Almeida et al., 2005). No mundo, os fitonematoides são responsáveis por perdas agrícolas que chegam a 12,3%, o que pode representar perdas que ultrapassam 125 bilhões de dólares ao ano (Sasser & Freckman, 1986; Chitwood, 2003). No Brasil, os prejuízos estão na ordem de 52,2 milhões de dólares anuais (Yorinori, 2000). A maioria desses danos é atribuída aos nematoides de galhas e as espécies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* recebem maior destaque, pois contribuem para 95% das perdas causadas por todos os nematoides formadores de galhas (Huang et al., 2006). Por essa razão, constituem preocupação constante para os sojicultores brasileiros há, pelo menos, 50 anos (Ferraz, 2001). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* representam os fitonematoides que causam grandes prejuízos para a agricultura mundial.

Os ataques por nematoides de galha devem se confundir com o próprio cultivo da soja, tão frequente é a verificação de infestação do solo utilizado para a sojicultura. Embora não existam relatos comprobatórios, é possível que, desde o século XIX, quando se procederam tentativas iniciais de introdução da cultura de soja no país, a ocorrência desses nematoides já fosse uma realidade (Ferraz, 2001). É difícil quantificar as perdas causadas pelos nematoides, pois a queda no rendimento das lavouras pode variar desde valores poucos expressivos até

perdas totais, quando as infestações atingem níveis mais elevados (Arantes et al., 2000).

A *Heterodera glycines* representa um dos principais fitonematoides que atacam a cultura da soja. Os nematoides de cisto possuem este nome por que, após a fecundação, a fêmea pode morrer e permanecer por vários anos no solo, como um cisto repleto de ovos. Quando o solo apresentar condições favoráveis, como o desenvolvimento de plantas hospedeiras, os J<sub>2</sub> do nematoides de cisto irão eclodir. Do ovo vai sair a larva infectiva J<sub>2</sub>, que vai penetrar numa ponta de raiz e o ciclo se repete. Os nematoides de cisto, geralmente, se reproduzem de forma sexuada e o macho adulto abandona o interior da raiz para fecundar a fêmea que está parcialmente inserida na raiz, mas com a porção posterior voltada para o meio externo. Os juvenis que eclodem dos ovos migram no solo para infectar novas raízes (Willianson & Gleason, 2003).

Os nematoides formadores de galhas são patógenos radiculares que estão adaptados ao parasitismo de quase todas as culturas produtoras de alimentos, infectando mais de 1.700 hospedeiros. A adaptação desses fitonematoides ocorre devido ao aumento populacional em um pequeno intervalo de tempo, à proteção no interior das raízes e, principalmente, ao hábito endoparasita sedentário aliado à partenogênese (apomixia) (Lilley et al., 1999; Trudgill & Blok, 2001; Huang et al., 2006).

Aproximadamente 92 espécies de *Meloidogyne* estão atualmente descritas em todo o mundo, tendo metade dessas espécies sido descoberta nos últimos vinte anos (De Waele & Elsen, 2007). Dentre as principais espécies de nematoides do gênero *Meloidogyne* que mais limitam a produção de soja no Brasil estão *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. Estas espécies são causadoras de galhas no sistema radicular e parasitam um grande número de espécies daninhas, dificultando seu controle (Almeida et al., 2005). O ciclo de

vida desses nematoides dura de três a quatro semanas na soja, com influência da temperatura (Figura 1).

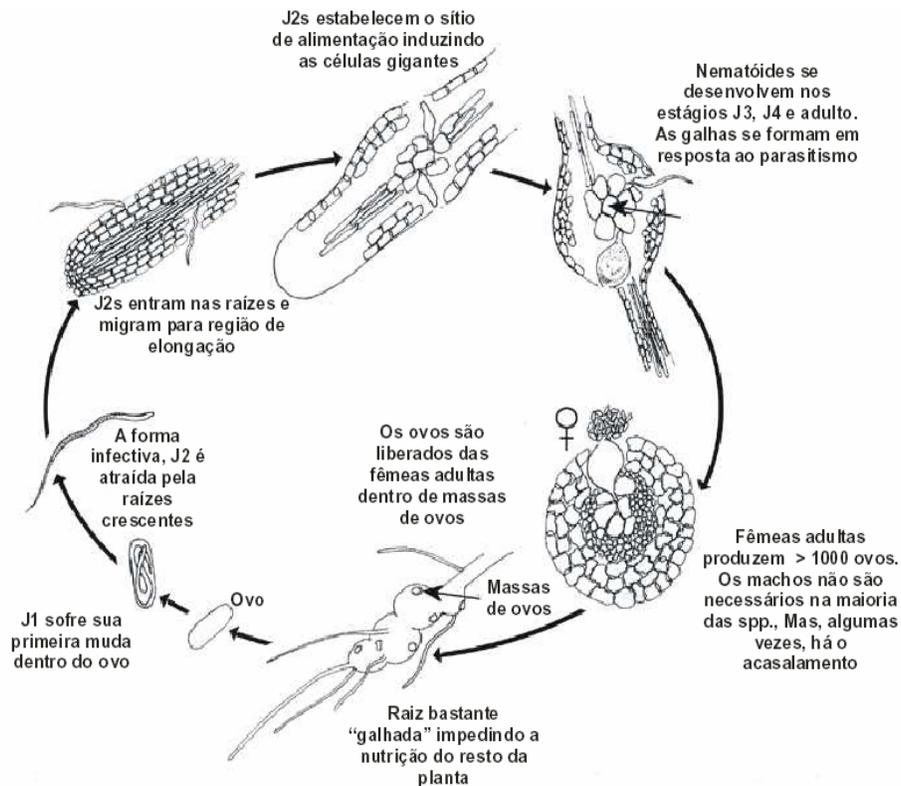


FIGURA 1 Ciclo de vida dos nematoides da galha (*Meloidogyne* spp.). São encontrados nesse gênero seis estádios de desenvolvimento: ovo, um estágio larval dentro do ovo (juvenil de primeiro estágio, J<sub>1</sub>), três estádios larvais que se alimentam da planta (juvenil de segundo, terceiro e quarto estádios, J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub> e J<sub>4</sub>) e a fase adulta. O J<sub>2</sub> é a forma infectiva e induz a formação das células gigantes. A fêmea se alimenta da planta e produz ovos a partir da partenogênese. Os ovos são colocados no solo iniciando novo ciclo (Proite, 2007).

O ambiente é um dos principais fatores que interferem na migração e na penetração J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* spp., o qual pode exercer influência pela umidade,

potencial osmótico, textura, aeração e temperatura, afetando, inclusive, a atividade e a sobrevivência desses (Van Gundy, 1985). Assim, a reprodução dos fitonematoides não depende somente do hospedeiro, mas também do sucesso de sua movimentação pelo solo, influenciada pelos poros e a espessura do filme de água existente nos espaços (Ferris & Ferris, 1998). A influência da temperatura na capacidade de penetração de J<sub>2</sub> já foi demonstrada para várias espécies de *Meloidogyne*, tendo alta taxa de penetração de J<sub>2</sub> de *M. javanica* em raízes de soja ocorrido sob temperatura média de 25°C, 48 horas após inoculação das plantas (Gourd et al., 1993; Pedrosa et al., 1996). No entanto, Campos (2003) observou maior penetração de J<sub>2</sub> de *M. javanica* em raiz de soja a, aproximadamente, 27°C, após 72 horas da inoculação.

Cada fêmea produz de 400 a 500 ovos por partenogênese mitótica. A partir de multiplicações celulares no ovo, ocorrem a formação do primeiro estágio juvenil (J1) e a formação do segundo estágio (J<sub>2</sub>), que eclode, cai no solo e penetra pelas raízes jovens por meio da secreção de proteínas de parasitismo (Figura 2).

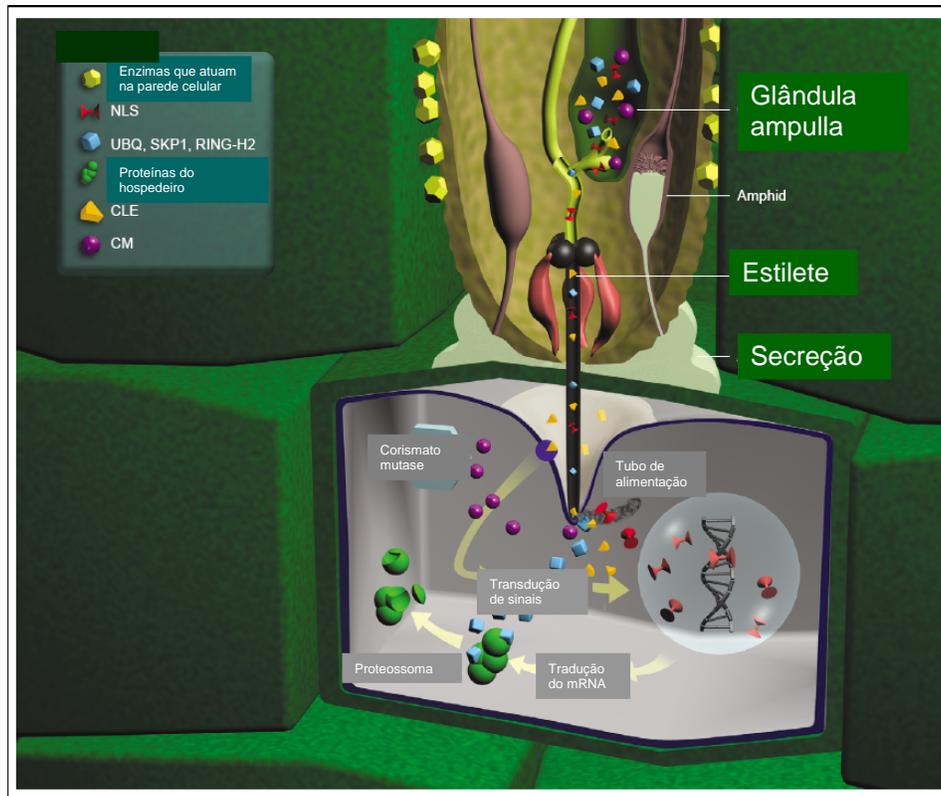


FIGURA 2 Representação esquemática da formação do sítio de alimentação de fitonematóides e moléculas que participam da interação planta-nematoide. Legenda: “Enzimas que atuam na parede celular” corresponde a enzimas de degradação de parede celular, como endoglucanases, xilanases e expansinas. “NLS” corresponde a sinais de localização nuclear, “UBQ, SKP1 e RING-H2”, relacionados com degradação seletiva de proteínas da célula hospedeira. “CLE” representa um peptídeo da família CLAVATA, importante para a formação das células gigantes. “CM” corresponde a corismato mutase, relacionada também com a formação do sítio de alimentação por meio de rediferenciação celular (Davis et al., 2004).

De modo geral, essas proteínas secretadas pelos fitonematóides fazem uma desprogramação da expressão gênica das células da planta hospedeira, a fim de transformá-la em dreno de nutrientes. Ocorre, então, a formação de células

hipertrofiadas, chamadas de células gigantes, que têm função de nutrir o nematoide. O juvenil de terceiro e do quarto estádios (J3 e J4) antecede a ovoposição e cada fêmea pode colocar até 2.850 ovos e o ciclo dura 28 dias em condições ideais (Campos, 1999; Ferraz, 2001; Davis et al., 2004; Almeida et al., 2005). Nematoides sedentários produzem ampla gama de proteínas de secreção, as quais são secretadas na interface do nematoide com as células hospedeiras. O estabelecimento e a manutenção do parasitismo têm sido fortemente correlacionados com as secreções proteicas de nematoides, nomeadas de proteínas de parasitismo, que estão relacionadas com os processos de migração e formação do sítio de alimentação, onde promovem uma mudança radical na expressão de genes e no metabolismo das células vegetais envolvidas (Davis et al., 2000; Davis et al., 2004).

Os danos causados pelos nematoides resultam dos múltiplos sítios de alimentação, ou seja, do conjunto de células gigantes estabelecidas no cilindro vascular, periciclo e endoderme e nas áreas do córtex em que ocorrem hiperplasia e ou hipertrofia celular. Dependendo da espécie de *Meloidogyne*, tais anomalias podem provocar forte compressão e até obliteração de elementos do vaso do xilema, resultando em completa desorganização do cilindro vascular (Ferraz, 2001). Os danos causados às plantas de soja parasitadas por *Meloidogyne* sp. envolvem desde a redução da parte aérea, com manchas cloróticas, necroses entre as nervuras, alteração no movimento estomático, alteração na distribuição de fotoassimilados, obliteração de feixes vasculares, que interfere no transporte de água e nutrientes, além de alterações na distribuição de fotoassimilados, espoliação de nutrientes para crescimento e reprodução do nematoide e redução na nodulação (Asmus, 2001, Henning et al., 2005).

### **2.3 Medidas de controle de fitonematoides na sojicultura**

As principais medidas de controle de fitonematoides aplicados à cultura de soja são a rotação de culturas e a utilização de cultivares resistentes (Henning et al., 2005). Outros métodos utilizados são uso de nematicidas, controle biológico e uso da transgenia para a inserção de genes de resistência e ou defesa.

A rotação de culturas para o controle desses patógenos deve ser planejada, uma vez que a maioria das espécies cultivadas pode ser atacada. Portanto, a presença de plantas daninhas na área pode possibilitar a reprodução e a sobrevivência dos nematoides. A escolha da rotação adequada deve se basear também na viabilidade técnica e econômica da cultura na região, sendo importante incluir espécies de adubos verdes resistentes à presença do nematoide, visando também à recuperação da matéria orgânica e da atividade microbiana do solo, possibilitando melhor controle dos nematoides (Almeida et al., 2005).

A maior limitação da rotação de culturas reside no fato de que as espécies do gênero *Meloidogyne* são polífagas, tendo como hospedeiros um enorme número de culturas, tornando seu uso impraticável para produtores especialistas de determinadas culturas (Trudgill & Blok, 2001; Huang et al., 2006). A identificação da espécie do nematoide de galha é de suma importância para programas de controle. A escolha da rotação ou da cultivar resistente depende de uma correta identificação da espécie e, se possível, da raça presente. A identificação da espécie do nematoide de galha baseia-se, principalmente, em características morfológicas e morfométricas (Almeida et al., 2005).

O uso de nematicidas sintéticos é outro método indicado, embora esteja sendo cada vez menos utilizado devido a sua toxidez ao homem e ao ambiente (McBride et al., 2000). Uma alternativa à utilização de nematicidas sintéticos é o uso de nematicidas naturais ou fitocompostos (Chitwood, 2002), que são produzidos naturalmente pelas plantas. Estes, na verdade, são metabólicos

secundários, como terpenoides, compostos fenólicos e nitrogenados. Alguns exemplos são o  $\alpha$ -Tertienil, a nimbidina e o pirocatecol (Huang, 1985).

A bactéria *Pasteuria penetrans* é uma parasita de fitonematoides que representa interessante controle biológico, uma vez que produz endósporos de tamanhos variados, os quais são resistentes ao dessecação e às altas temperaturas. Esses endósporos aderem aos juvenis de *Meloidogyne* spp. e, no estágio adulto, produzem até dois milhões de endósporos que matam os ovos e os juvenis (Campos, 1999).

Outro método de controle é a utilização de plantas antagonistas, como *Crotalaria*s e *Mucuna*s, que atraem os nematoides, porém, não permitem a formação de sítios de alimentação desses nematoides em seus tecidos, impedindo sua alimentação, ocasionando morte (Campos, 1999).

Para o agricultor, o uso de variedades resistentes é a alternativa mais utilizada no controle de fitonematoides, por ser o método mais econômico e fácil, especialmente para controle de nematoides do gênero *Meloidogyne* (Ferraz, 2001; Silva, 2001; Almeida et al., 2005), apresentando ainda vantagens, tais como: redução do período de rotação, diminuição da reprodução dos fitonematoides, redução da contaminação do ambiente, não requer maquinaria específica e, em geral, a aquisição das sementes tem um custo similar ao das cultivares susceptíveis (Boerma & Hussey, 1992). A inclusão de variedades resistentes aos nematoides deve ser por esquema de rotação ou plantio direto (Ferraz, 2001).

#### **2.4 Resistência de soja a nematoides**

Uma vez que a erradicação dos nematoides é praticamente impossível e economicamente inviável, o desenvolvimento de cultivares resistentes torna-se uma das medidas de controle mais eficazes e eficientes para o produtor. A resistência ocorre, normalmente, nas plantas e é transferida para cultivares a

partir de linhagens de melhoramento ou parentais silvestres, por meio de métodos de melhoramento convencional. A resistência também pode ser obtida utilizando-se técnicas moleculares.

Tradicionalmente, o progresso no melhoramento genético de plantas tem se baseado exclusivamente em análises fenotípicas. Comparando as populações domésticas com as selvagens, verifica-se que, com a seleção artificial, obtiveram-se grandes sucessos na alteração dos fenótipos. Porém, os materiais genéticos disponíveis para o melhoramento em algumas espécies, como o milho e a soja, por exemplo, já foram muito melhorados em relação aos seus ancestrais selvagens e, atualmente, apenas pequenos ganhos estão sendo obtidos, pois a variabilidade genética explorada nesses materiais tornou-se pequena em muitos programas de melhoramento (Almeida et al., 2005).

No Brasil, diversas cultivares resistentes ou moderadamente resistentes a *M. incognita* e ou *M. javanica* estão disponíveis no mercado, porém, a maioria é descentente de uma única fonte de resistência, a cultivar norte-americana Bragg (Embrapa, 2008). Portanto, a identificação de novos genes de resistência por meio de técnicas moleculares será bastante útil na obtenção de novas cultivares de soja via transgenia.

Características quantitativas, por serem controladas por vários genes, tornam-se muito sensíveis às interações com o meio ambiente, o que tem dificultado bastante o entendimento de suas bases moleculares (Shnabel et al., 1999). Além disso, o desenvolvimento dos nematoides é altamente dependente de condições ambientais, especialmente da temperatura, tendo sido obtidos melhores resultados em casa de vegetação, onde a temperatura se mantém entre 27° e 29° C (Shannon, 1989). Embora os melhoristas de plantas venham obtendo bastante êxito na manipulação dessas características por intermédio de métodos convencionais, um melhor entendimento da organização e funcionamento do genoma nas plantas melhorará a eficiência dos programas de melhoramento

genético e a elaboração de novas estratégias para a obtenção de resistência a doenças (Shnable et al., 1999).

A cultivar BRSMG 250 Nobreza, lançada em 2003 pela parceria Embrapa, Epamig e Fundação Triângulo, é de ciclo semiprecoce e resistente ao nematoide de cisto (*Heterodera glycines*), raça 3, propiciando um bom desempenho nas regiões de Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso e Bahia. Esta cultivar pode ser utilizada em estudos de interação molecular soja-*Meloidogyne*, uma vez que é suscetível a nematoides desse gênero. Há grande disponibilidade de variedades com diferentes graus de resistência a *M. incognita*. Em contraste, há pouca disponibilidade de variedades resistentes a *M. javanica* (Almeida et al., 2005). A linhagem de soja PI 595099 foi desenvolvida pela *Georgia Agricultural Experiment Station*, nos Estados Unidos e possui expressiva resistência aos nematoides de galha *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, além de resistência ao nematoide do cisto da soja *H. glycines* (raças 3 e 14) e resistência também a *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines*. Tem resistência comparada à linhagem de soja PI 230977, que representa a linhagem de soja com o maior nível de resistência encontrado em bancos de germoplasma (Silva et al., 2002). Também foi encontrada uma resistência moderada (50% das plantas) dessa linhagem ao afídeo de soja *Aphis glycines* Matsumura, com modalidade de resistência baseada na redução de ninfoposição (Hesler et al., 2007).

A linhagem PI 595099 foi obtida pelos cruzamentos G83-559 X (G80-1515 x PI 230977) e possuía o número de acesso G93-9223, no banco de germoplasma (Luzzi et al., 1997). No cruzamento de PI 595099 com um parental susceptível BRS 133, foi mostrado que a herança da resistência dessa linhagem está ligada a dois genes complementares, com distribuição independente e ausência de dominância, sendo esta quantitativa e controlada por

efeitos aditivos e epistáticos, do tipo aditivo por aditivo, dos genes que controlam o caráter (Silva et al., 2001).

Os estudos de genótipos resistentes e seus genes naturais de resistência (genes *R*) são de suma importância. Vários genes de resistência específica a nematoides já foram encontrados, como, por exemplo, o *Mil*, que confere resistência específica ao tomateiro aos nematoides da galha, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Milligan et al., 1998; Vos et al., 1998; Seah et al., 2004); o *Gpa2*, que confere resistência de *Globodera pallida* a batata (Van der Vossen et al., 2000); o gene *Hspro-1*, que confere resistência da beterraba (*Beta Vulgaris* L.) a *Heterodora schachtii* (Thurau et al., 2003); o gene *Cre3*, conferindo resistência ao trigo a *H. avenae* (Lagudah et al., 1997) e os genes *Me1 e 3*, que conferem ao pimenteiro (*Capsium annuum*) resistência a *M. incognita* (Bleve-Zacheo & Bongiovanni, 1998). Em soja, foram encontrados o *Rgh1 e 4* que conferem resistência a *H. glycines* (Meksen et al., 2001). Entretanto, observa-se que os nematoides possuem estratégias para a quebra da resistência elaborada em plantas por genes de resistência naturais.

Outra estratégia promissora para a obtenção de resistência a fitonematoides consiste na introdução de resistência em plantas de interesse agrônômico, via transgenia. Existem, basicamente, três estratégias para a obtenção de resistência engenheirada: 1) expressão transgênica de genes de resistência natural em espécies heterólogas; 2) alvo e ruptura do nematoide e 3) atenuação do sítio de alimentação. Esta estratégia permite uma seleção mais específica de alvos no nematóide, levando ao controle eficiente desses parasitos pela interferência em seus sistemas digestivo, nervoso ou reprodutor, por meio do uso de inibidores de enzimas digestivas e toxinas que atuem em alguma etapa do ciclo de vida do fitonematoide. Plantas transgênicas de beterraba com resistência a *Heterodora schachtii* (Urwin et al., 2002, Cai et al., 2003), de fumo com resistência a *M. incognita* (McLean et al., 2003) e de tomate com

resistência a *M. incógnita* são exemplos que demonstram a eficiência do método, utilizando-se a ação tóxica de *Cry6A* (Li et al., 2007).

## **2.5 Estudos de expressão gênica envolvendo interação soja-nematoide**

Muitas alterações fisiológicas associadas com respostas a estresses em plantas são controladas de forma transcricional. Estima-se que plantas superiores, como a soja, tenham entre 80.000 a 100.000 genes que serão expressos ou não nas diferentes fases de desenvolvimento e ou em resposta aos diferentes fatores, bióticos e abióticos, a que estas plantas estarão expostas, durante seu ciclo de vida (Nepomuceno et al., 2002).

Portanto, o estudo da expressão gênica em linhagens resistentes de soja é muito importante e vem complementar os estudos até agora realizados, incluindo o sequenciamento do genoma estrutural do grão de soja (<http://agro-latina.com/news/noticias.php?noticia=231>). Esses dados facilitam estudos para a produção de novas variedades de soja e o melhor entendimento dos mecanismos genéticos ligados à resistência a doenças, mecanismos de tolerância a estresses abióticos e produção de óleo. Concomitantemente ao estudo da genômica estrutural, o estudo da genômica funcional é de fundamental importância, uma vez que busca desvendar a função dos genes encontrados associados ao tipo de estresse de interesse.

No Brasil, a Embrapa Soja participa de projetos que incluem montagem de bancos de genes, focalizando seus estudos na resposta ao ataque por nematoides. Estão sendo geradas informações por meio de sequenciamento massal de bibliotecas de cDNA e mais de 7.500 clones já foram sequenciados (Embrapa, 2006). Recentemente, importantes projetos foram aprovados no Brasil, como o Consórcio Nacional de Estudos do Genoma Soja, o Genosoja, que envolve laboratórios e grupos de pesquisa do Brasil inteiro, visando à realização de estudos de genômica estrutural e funcional, transcriptoma e

proteoma da soja, incluindo a construção de bibliotecas de cDNA de raízes de soja resistente a fitonematoides.

Alguns trabalhos de expressão gênica vêm contribuindo para elucidar a resposta de raízes de soja a fitonematoides, como os de Alkharouf et al. (2004), Khan et al. (2004), Klink et al. (2005), Alkharouf et al. (2006), Ithal et al. (2007a), Ithal et al. (2007b) (Tabela 1).

TABELA 1 Genes diferencialmente expressos durante a interação molecular planta-nematoide

Processo biológico	Planta	Nematoide e técnica de análise	Referência
▲ Defesa	<i>Glycine max</i>	<i>Heterodera glycines</i>	(Khan et al., 2004)
▲ Resposta a estresse (peroxidase; SAM22)		(Microarranjo)	
▲ Metabolismo de carboidrato			
▲ Sinalização celular			
▲ Desconhecida			
▲ Defesa (SRG2)	<i>Glycine max</i>	<i>Heterodera glycines</i>	(Klink et al., 2005)
▲ Canal de água (GmPIP2,2)		(Biblioteca de EST)	
▲ Citoesqueleto (GmTubA1; GmTubB4)			
▲ Ligação a DNA (MYB-related protein)			
▼ Catabolismo de proteína (ubiquitina)			
▼ Defesa (PR1)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	(Bar-OrL et al., 2005)
▼ Resposta a estresse (peroxidase)		(Microarranjo)	
▲ Relacionado com etileno			
▲ Relacionado com patogênese			

(...continua...)

TABELA 1, Cont.

▲ Fator de transcrição (relacionado ao desenvolvimento; WRKY)			
▲ Defesa	<i>Glycine max</i>	<i>Heterodera glycines</i>	(Ithal et al., 2007a)
▲ Resposta a estresse (peroxidase)		(Microarranjo)	
▲ Metabolismo primário e secundário			
▲ ▼ Modificação de parede celular			
▲ Crescimento e desenvolvimento vegetal e sinalização celular			
▲ Fator de transcrição (WRKY; bZIP; ERF; MYB)			
▲ Relacionado com patogênese	<i>Glycine max</i>	<i>Heterodera glycines</i>	(Ithal et al., 2007b)
▲ Metabolismo primário e secundário		(Microarranjo)	
▲ ▼ Modificação de parede celular			
▲ Biossíntese de lignina e suberina			
▲ ▼ Transportador de açúcar, íon de metal e aminoácido			
▲ ▼ Relacionado com auxina			
▲ ▼ Relacionado com etileno			
▼ Relacionado com citocinina, giberelina, ácido jasmônico			
▲ arp (genes reprimidos pela auxina)	<i>Arachis spp.</i>	<i>Meloidogyne arenaria</i>	(Proite, 2007)
▼ Citocinina oxigenase		(Biblioteca de EST)	
▼ Metalotioneína (relacionado a estresse)			
▼ Resveratrol sintase			
As setas indicam ativação (▲) ou inibição (▼) putativa dos processos biológicos como resultado da predominância de genes individuais ativados ou inibidos, medidos experimentalmente			

TABELA adaptada de Fragoso et al. (2007).

Por meio de uma abordagem empregando microarranjos, 429 genes diferencialmente expressos em raízes de soja suscetível, inoculadas e não inoculadas com *Heterodera glycines*, foram revelados (Ithal et al., 2007a). Estão incluídos genes que codificam enzimas que estão envolvidas no metabolismo primário, biossíntese de compostos fenólicos, lignina e flavonoides, genes relacionados a estresse e resposta de defesa, modificações da parede celular, sinalização celular e regulação transcricional. Parte dos genes de soja desse trabalho que foram validados por meio da técnica de PCR em tempo real (*qPCR*) tiveram indução da expressão em 2, 5 e 10 dias após a inoculação (d.a.i.) e, entre eles, estão incluídos genes que codificam uma proteína do transporte de auxina (*EIR1*), *Ferritina*, *expansina (EXPR3)*, gene da família de proteína responsiva na interação doença/resistência, gene que codifica proteína da família da lacase, *chalcona sintase*, genes *PR* (relacionados a patogênese) do tipo *PR-5* e *PR-1*, *Tripsina* e gene que codifica uma proteína quinase de transmembrana. Entre os genes cuja expressão foi suprimida pelo nematoide em 2, 5 e 10 d.a.i. estavam incluídos pectinesterase, transportador de nitrato (*NTP2*) e citocromo P450 e que codificam proteínas que regulam a giberelina. Um ERF (fator de resposta ao etileno) foi encontrado sendo suprimido no segundo dia, mas induzido no 5 e 10 d.a.i. (Ithal et al., 2007a).

Em raízes de soja suscetível e inoculada com *Heterodera glycines* foi mostrado o papel de fito-hormônios na expressão de genes que codificam modificações proteicas na parede celular. Estes processos parecem ser fortemente controlados e coordenados na regulação da rigidez da parede celular, podendo estar envolvidos na lignificação das células de alimentação. Outros dados mostram que a inibição da biossíntese de ácido jasmônico responde ao desenvolvimento do sincício, como também sugere uma supressão local nos mecanismos de defesa da planta (Ithal et al., 2007b). Bibliotecas de cDNA

contruídas a partir de células de cultivar de soja suscetível a *H. glycines* contendo sincísios indicaram aumento de expressão gênica de uma aquaporina (*Gm PIP2*, 2), de  $\alpha$ -tubulin (*GmTubA1*) e  $\beta$  b-tubulin (*GmTubB4*). Outros genes foram expressos como proteínas ribossomais (S19, L11, L31, S21, S26) (estruturas constituintes dos ribossomos), extensinas (rede de glicoproteínas), BEL 1, G-Box binding protein, DNA binding protein p24, MYB (fatores de transcrição), proteína Kinase cf-9, metalotioneína (se liga a metais), peroxidase, ferredoxina-tiorredoxina redutase, modulador de respostas de giberelina, glutathione peroxidase e fator de splicing 3B, dentre outros (Klink et al., 2005).

Em soja susceptível a *H. glycines*, a análise de expressão pela técnica de *microarray* mostrou expressão diferencial dos genes *SAM22* (PR-10) e *Germin-like* (atividade antimicrobiana), ambos relacionados à patogênese, inibidor de tripsina, do gene de estresse induzido (relatado a estresse), peroxidase (EC 1.11.1.7), fosfolipase D, provável 12-oxifitodienoate reductase (metabolismo relacionado a estresse), trealose-6-fosfato sintase, Coumarate CoA ligase (envolvido na síntese de metabólitos secundário), 6-Deoxychalcone sintase (rota de fenilpropanoides), chalcona redutase (rota de fenilpropanoides), *heat shock* proteína 90, 70 (degradação de proteínas), peroxidase (detoxificação), 60S, 40S, 20S proteínas ribossomais (síntese de proteínas), peptidilpropil isomerase (fator de iniciação), 4A-15, frutose-bisfosfato aldolase (metabolismo de açúcares), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (metabolismo de açúcares), sacarose sintase, frutoquinase, malato desidrogenase, calmodulina (relacionada a cálcio), proteína de transporte de sacarose, triose fosfato, fosfolipase C, metalotioneína, lipoxigenase (biossíntese do ácido jasmônico), fator de transcrição WRKY (resposta de defesa), 4-Coumarate CoA ligase (envolvido na síntese de metabolismos secundários) e Citocromo P450 (Alkharouf et al., 2006).

Outro estudo envolvendo raízes de soja susceptível a *H. glycines*, por meio da técnica de *microarray*, comprovou a indução dos genes que codificam

proteína rica em prolina, peroxidase, protease aspártica, fatores de transcrição em cloroplastos, proteína ribossomal S8, quitinase (classe3), sacarose sintase e beta-1,3 endoglucanase (Khan et al., 2004).

Comparando-se com a resposta de outras espécies suscetíveis à inoculação com nematoides do gênero *Meloidogyne*, é possível observar a presença de alguns dos genes encontrados como significativos durante a interação soja suscetível-*Heterodera*. Em amendoim suscetível inoculado com *M. arenaria*, foram induzidos alguns genes diferencialmente expressos, como os genes do tipo *arp* (gene da proteína reprimida pela auxina) e, dentre os genes reprimidos, estão a citocinina oxigenase, a metalotioneína e a resveratrol sintase, dentre outros (Proite, 2007).

Já a caracterização do perfil transcricional de raízes de tomateiro susceptível a *M. javanica* revelou que genes como peroxidase e proteína hoteótica *VHAOXI* (expresso no floema durante o crescimento secundário) tiveram sua expressão reprimida pelo nematoide. Por outro lado, o gene que codifica um coativador transcricional responsivo ao etileno teve sua expressão inicialmente reprimida aos 5 d.a.i. e induzida aos 10 d.a.i., enquanto genes que codificam fatores transcricionais da família WRKY (comum repressor da regulação de genes *PR-1*), proteínas de defesa da planta e proteína tipo giberelina-2-oxidase (enzimas envolvidas na desativação da giberelina) tiveram sua expressão induzida pelo ataque do nematoide (Bar-Or et al., 2005).

Até o presente momento não foram encontrados estudos que envolvem técnicas de proteômica e metaboloma, na interação soja-*Meloidogyne*, mostrando, assim, a necessidade de estudos nessas áreas para complementar os trabalhos já realizados.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKHAROUF, N. W.; KLINK, V. P.; CHOUIKHA, I. B.; BEARD, H. S.; MACDONALD, M. H.; MEYER, S.; KNAP, H. T.; KHAN, R. MATTHEWS, B. F. Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *GlycIn:e max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycIn:es* (soybean cyst nematode). **Planta**, Berlin, v. 224, n. 4, p. 838-852, 2006.

ALKHAROUF, N.; KHAN, R.; MATTHEWS, B. Analysis of expressed sequence tags from roots of resistant soybean infected by the soybean cyst nematode. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 380-388, 2004.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da Soja (*GlycIn:e Max* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, 663p.

ARANTES, N. E.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A. Resistência da soja aos nematóides. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22., 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU/ICIAG, 2000. p. 66-70.

ASMUS, G. L. Danos Causados à cultura da soja por nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 39-62.

BAR-ORL, C.; KAPULNIK, Y.; KOLTAI, H. A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, n. 111, p. 181-192, 2005.

BLEVE-ZACHEO, T.; BONGIOVANNI, M.; MELILLO, M. T.; CASTAGNONE-SERENO, P. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. **Plant Science**, Limerick, v. 133, n. 12, p. 9-90, 1998.

BOERMA, D.; HUSSEY, R. S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 24, p. 242-252, 1992.

CAI, D.; T. THURAU, T.; TIAN, Y.; LANGE, T.; YEH, W.; JUNG, C. Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 6, p. 839-49, 2003.

CAMPOS, H. D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycIn:es*) em soja**. 2003. 203 p. Doutorado (Tese em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAMPOS, V. P. **Manejo de doenças causadas por fitonematoídes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 124 p.

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services. **Pest Management Science**, Basel, v. 59, p. 748-753, 2003

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Dados de produção**. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 1 jan. 2009.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S. BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 134-41, 2004.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J.; BAKKER, J.; SCHOTS, A.; ROSSO, M. N. ABAD, P. Nematode Parasitism Genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 365-396, 2000.

DE WAELE, D.; ELSSEN, A. Challenges in tropical plantnematology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 457-85. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja-região central do Brasil-2009-1010**. Londrina: Embrapa Soja/Embrapa Cerrados/Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 262 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Dados econômicos. Diferentes usos do grão. Biotecnologia.** Disponível em: <[www.cnpso.embrapa.br](http://www.cnpso.embrapa.br)>. Acesso em: 2 mar. 2006 e 1 jan. 2009.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja : passado, presente e futuro. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja.** Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 15-34.

FERRIS, J. M.; FERRIS, V. R. Biology of plant-parasitic nematodes. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions.** Hardcover: American Society of Agronomy, 1998. p. 21-35.

FRAGOSO, R. R.; VIANA, A. A. B.; LOURENÇO, I. T.; SOUZA, D. S. L.; LIMA, L. M.; MEHTA, A.; ROMAN, E.; ROCHA, T. L.; GROSSI DE SA, M. F. **Interação molecular planta-nematóide.** Embrapa Cerrados, 2007 (Documentos).

GOURD, T. R.; SCHMITT, D. P.; BARKER, K. R. Penetration rates of second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. **Journal of Nematology**, College Park, v. 25, n. 1, p. 38-41, 1993.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja.** Londrina: Embrapa, 2005. 71 p. (Documentos, 256).

HESLER, L. S.; DASHIELL, K. E.; LUNDGREN, J. G. Characterization of resistance to *Aphis glycines* in soybean accessions. **Euphytica; netherlands journal of plant breeding**, Wageningen, v. 154, p. 91-99, 2007.

CIENTISTAS conseguem sequenciar o genoma da soja. Disponível em: <<http://agro-latina.com/news/noticias.php?noticia=231>>. Acesso em: 08 jan. 2009.

HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 39, p. 14302-14306, 2006.

HUANG, J. S. Mechanics of resistance to root-knot nematodes. In : SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Raleigh: North Carolina State University, 1985. v. 1, p. 165-174.

ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; HEARNE, L.; MAIER, T.; BAUM, T. J. MITCHUM, M. G. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 20, n. 3, p. 293-305, 2007a.

ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; MAIER, T.; BAUM, T. J.; MITCHUM, M. G. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 20, n. 5, p. 510-525, 2007b.

KHAN, R.; ALKHAROUF, N.; BEARD, H.; MCDONALD, M.; CHOUIKHA, I.; MEYER, S.; GREFENSTETTE, J.; KNAP, H.; MATTHEWS, B. Microarray analysis of gene expression in soybean roots susceptible to the soybean cyst nematode two days post invasion. **Journal of Nematology**, College Park, v. 36, p. 241-248, 2004.

KLINK, V. P.; ALKHAROUF, N.; MACDONALD, M.; MATTHEWS, B. Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of Glycine max (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 6, p. 965-979, 2005.

LAGUDAH, E. S.; MOULLET, O.; APPELS, R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 5, p. 659-665, 1997.

LI, X. Q.; WEI, J. Z.; TAN, A.; AROIAN, R. V. Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, n. 5, v. 4, p. 455-64, 2007.

LILLEY, C. J.; DEVLIN, P.; ATKINSON H. J. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 10, p. 414-7, 1999.

LUZZI, B. M.; BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S; PHILLIPS, D. V.; TAMULONIS, J.; FINNERTY, S. L.; WOOD, E. D. Registration of Javanese root-knot nematode resistant soybean germplasm line G 93-9223. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 1372-1375, 1997.

MCBRIDE, R. G.; MIKKELSEN, O. R. L.; BARKER K. R. The role of low molecular weight organic acids from decomposing rye in inhibiting root-knot nematode populations in soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 243-251, 2000.

MCLEAN, M. D.; YEVTUSHENKO, D. P.; DESCHENE, A.; CAUWENBERGHE, O. R.; MAKHMOUDOVA, A.; POTTER, J. W.; BOWN, A. W.; SHELP, B. J. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root-knot nematode. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 277-285, 2003.

MEDINA, J.C. Introdução e evolução da soja no Brasil. Primeiras notícias de soja no Brasil. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 17.

MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJITI, V. N.; HYTEN, L. D.; ARELLI, P. R.; LIGHTFOOT, D. A. 'Forest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, n. 5, p. 710-717, 2001.

MILLIGAN, S. B.; BODEAU, J.; YAGHOOBI, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P. WILLIAMSON, V. M. The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1307-1319, 1998.

MULLER, L. Taxonomia e morfologia. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 65-108.

NEPOMUCENO A. L.; SILVA, J. F. V.; LEMOS, E. G. M.; BINNECK, E.; CARNEIRO, N.; MARIN, S. R.; SILVEIRA, C. A.; WENDLAND, A.; BASSOI, M. C.; ALMEIDA, A. M.; MORALES, A.; BENEVENTI, M. A.; GIACOMINI, N.; STOLF, R.; FUGANTI, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; ARIAS, C. A.; MOLINA, J. C. Genoma funcional de raízes de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., 2002, Fóz do Iguaçu. **Resumos...** Londrina, PR: Embrapa, 2002. v. 181, p. 15.

PEDROSA, E. M. R.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Penetration and post-infectious development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* race 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 28, n. 3, p. 343-351, 1996.

PROITE, K. **Buscas de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao nematóide das galhas (*Meloidogyne arenaria*)**. 2007. 213 p. Tese (Doutorado)-Universidade de Brasília, 2007. 213p.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology- the role of society. **Journal of Nematology**, College Park, v. 18, n. 4, p. 596-596, 1986.

SEAH, S.; YAGHOUBI, J.; ROSSI, M.; GLEASON, C. A. WILLIAMSON, V. M. The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, n. 8, p. 1635-1642, 2004.

SEDIYAMA, T.; REIS, M. S.; MORENO, F. Introdução e evolução da soja no Brasil. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 36-39.

SHANNON, J. G. Breeding for resistance to races of soybean cyst nematode. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1987, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: Association Argentina de la Soja, 1989. p. 2071-2076.

SHNABLE, P. S.; WEN, T. J.; HSIA A. P. O papel da análise genômica no entendimento de caracteres quantitativos e heterose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina Embrapa Soja, 1999. p. 211-214. (Embrapa Documentos, 124).

SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações Parasito-Hospedeiro nas Meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p.95-127.

SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S.; YORINORI, J. T.; ALMEIDA, A. M. R.; ARIAS, C. A. A.; KIIHL, R. A. S.; ALMEIDA, L. A.; OLIVEIRA, E.; LIMA, C. G.; SCHÖBER, I. C.; GOULART-FILHO, G.; ALIGLIERI, G. M.

G.; GOMES, J. I.; SOUZA, N. V.; BENATO, L. C. **Contribuição ao desenvolvimento de linhagens de soja com resistência a patógenos**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

SILVA, J. F. V.; FERRAZ, L. C. C. B.; ARIAS, C. A. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. **Nematropica**. Bradenton, v. 31, p. 211-219, 2001.

THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C.; CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene Hs1pro-1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 52, n. 3, p. 643-660, 2003.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 53-77, 2001.

URWIN, P. E.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 747-752, 2002.

VAN DER VOSSSEN, E. A.; VAN DER VOORT, J. N.; KANYUKA, K.; BENDAHMANE, A.; SANDBRINK, H.; BAULCOMBE, D. C.; BAKKER, J.; STIEKEMA, W. J. KLEIN-LANKHORST, R. M. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 567-576, 2000.

VAN GUNDY, S. D. Ecology of *Meloidogyne* spp. - emphases on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina: Raleigh, 1985. v. 1, p. 177-182.

VOS, P.; SIMONS, G.; JESSE, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.; HOGERS, R.; FRIJTERS, A.; GROENENDIJK, J.; DIERGAARDE, P.; REIJANS, M.; FIERENS-ONSTENK, J.; DE BOTH, M.; PELEMAN, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J. ZABEAU, M. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 13, 1365-1369, 1998.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON C. A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion Plant Biology**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 327-33, 2003.

YORINORI, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Fundação MT, 2000. p.165-169.

## CAPÍTULO 2

### **Análise histopatológica da resistência ao nematóide da galha em genótipos de soja**

#### **1 RESUMO**

LOPES, Marcus José Conceição. Análise histopatológica da resistência ao nematoide da galha em genótipos de soja. In: \_\_\_\_\_. **Aspectos histopatológicos e mudanças na expressão de genes em genótipos de soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica***. 2009. Cap. 2, p. 30-49 Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.\*

A penetração e o desenvolvimento de juvenis de *Meloidogyne javanica* foram estudados em raízes de soja resistente (PI 595099) e suscetível ('BRSMG 250 Nobreza'), inoculando-se 500 J<sub>2</sub>/planta. As raízes foram coletadas nos tempos de 24, 48, 96, 144 e 192 horas após a inoculação (h.a.i.) e plantas foram mantidas até 45 dias, para a avaliação do número de galhas, massas de ovos e população total. Em geral, em todos os tempos analisados, observou-se maior penetração de juvenis na cultivar Nobreza. A partir de 144 h.a.i., houve predomínio de juvenis salsichoides (terceiro e ou quarto estádios) no genótipo suscetível e formação de células gigantes às 192 h.a.i. Nesses mesmos períodos, a maioria dos juvenis mostrava-se filiforme (segundo estágio), porosa e pouco corada no genótipo resistente. A formação de galhas e massas de ovos após 45 dias da inoculação foi maior no genótipo suscetível e menor no resistente. As pesquisas histopatológicas, aliadas à baixa formação de galhas e massas de ovos encontrada na linhagem PI 595099, evidenciam a existência de uma barreira que limitou o pleno desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes desse genótipo.

---

\* Comitê orientador: Luciano Vilela Paiva (UFLA-Orientador), Magnólia de Araújo Campos (UFCG), Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

## 2 ABSTRACT

LOPES, Marcus José Conceição. Histopathological aspects of root-knot nematode resistance in soybean genotypes. In: \_\_\_\_\_. **Histopathological aspects and changes in gene expression within resistant soybean genotypes during interaction with *Meloidogyne javanica***. Chap. 2, 2009. p. 30-49. Thesis (Doutorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.\*

The penetration and development of second stage juveniles ( $J_2$ ) of *Meloidogyne javanica* were studied in soybean roots of resistant (PI 595099) and susceptible (250 BRSMG Nobreza) genotypes, inoculating 500  $J_2$ /plant. The roots were collected in the time courses of 24, 48, 96, 144 and 192 hours after the inoculation (h.a.i.) and the plants were kept up to 45 days for evaluation of gall number, egg mass index and total population. In general, in all the analyzed times, it was observed higher  $J_2$  penetration in ‘Nobreza’. From 144 h.a.i. there was predominance of swollen juveniles ( $J_3/J_4$  juveniles) in the susceptible genotype and formation of giant cells at 192 h.a.i.. In these same periods, the majority of the juveniles showed as filiforms (second stage), porous and almost colorless in the resistant genotype. The formation of galls and egg masses after 45 days of inoculation was higher in the susceptible genotype than in the resistant one. The histopathological findings, the reduced gall formation and egg masses found in PI 595099 evidenced that there was a barrier that limited the complete development of *M. javanica* in the roots of this genotype.

---

\* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva-UFLA (Major professor), Magnólia de Araújo Campos (UFMG), Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

### 3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos. Na safra 2007/2008, a cultura ocupou área de 20,687 milhões de hectares em todo o Brasil, o que totalizou uma produção de 58,4 milhões de toneladas, sendo o estado de Mato Grosso o maior produtor nacional. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que a soja tem importante participação nas exportações brasileiras (6,77% do total exportado). Além de representar divisas, trata-se de um grão muito versátil que dá origem a diversos produtos muito usados pela agroindústria, pela indústria química e pela indústria de alimentos. Recentemente, vem crescendo também a utilização da soja como fonte alternativa de combustível, para a produção de biodiesel (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, 2009).

A produção da soja, geralmente, esbarra em fatores limitantes, como, por exemplo, o ataque de nematoides, levando a grandes perdas econômicas. Na safra 1999/00, esses fitoparasitas causaram prejuízos, no Brasil, da ordem de US\$52,2 milhões (Yorinori, 2000). No Brasil, há várias espécies de nematoides do gênero *Meloidogyne*, entretanto, *M. incognita* e *M. javanica* são as que mais limitam a produção de soja no Brasil (Almeida et al., 2005). A polifagia das espécies de *Meloidogyne*, a variabilidade fisiológica e sua ampla disseminação nas diversas regiões produtoras constituem sérias limitações à adoção de medidas de controle, particularmente a rotação de culturas (Manzotte et al., 2002).

As nematoses causadas por *Meloidogyne* spp. atacam em reboleiras devido à baixa mobilidade no solo e os sintomas são atrofiamento e clorose das plantas até o centro da reboleira, onde pode ocorrer morte dessas se o nível desses nematoides for muito alto (Almeida et al., 2005). Na parte radicular, os

sintomas são alterações neoplásicas (galhas), obliteração de feixes vasculares interferindo na translocação de água e nutrientes, alterações na distribuição de fotoassimilados, espoliação de nutrientes para crescimento e reprodução do nematoide e redução na nodulação (Asmus, 2001).

O uso de cultivares resistentes é o método mais eficiente para o controle de nematoides do gênero *Meloidogyne* (Ferraz, 2001; Silva, 2001; Almeida et al., 2005). De acordo com Boerma & Hussey (1992), algumas vantagens podem ser proporcionadas pela utilização de cultivares resistentes, tais como supressão da reprodução desses nematoides, redução do período de rotação, redução do nível de contaminação do ambiente, não requerimento de equipamentos especiais para utilização e possibilitar, no geral, a aquisição das sementes a um custo similar ao das cultivares suscetíveis.

As linhagens de soja PI 96354 e PI 417444, consideradas altamente resistentes a *M. incognita*, são utilizadas em estudos que envolvem a penetração e o desenvolvimento de juvenis em raízes de soja (Herman et al., 1991). A PI 595099, genótipo silvestre resistente aos nematoides de galha, vem sendo utilizada no melhoramento de soja no Brasil e constitui excelente alternativa aos estudos dos mecanismos de resistência da soja aos nematoides de galha (Silva et al., 2001). No entanto, o mecanismo da resistência ainda não foi totalmente elucidado.

A caracterização dos mecanismos de resistência da linhagem PI 595099 a nematoides pode levar ao uso desse genótipo em programas de melhoramento de soja, com impactos para a elaboração de estratégias de resistência eficientes e duradouras a esse parasita. Este trabalho apresenta um estudo da penetração e monitoramento do tempo do curso do desenvolvimento de juvenis de *M. javanica* em raízes de soja da linhagem resistente PI 595099 e da cultivar BRSMG 250 Nobreza, desenvolvida pela parceria Embrapa, Epamig e Fundação Triângulo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo de juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivados em casa de vegetação e infestados com *M. javanica* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de, aproximadamente, 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador, por 50 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, de acordo com a técnica de Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, adicionaram-se aproximadamente, 2 g de caulim por tubo da centrífuga (50 mL), realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer, utilizando-se pisseta contendo água destilada. Para a obtenção dos J<sub>2</sub>, utilizou-se uma câmara de eclosão formada com tela e papel de espessura fina, colocados em funil de vidro à temperatura ambiente. A quantificação dos juvenis foi realizada em microscópio estereoscópico, utilizando-se câmara de Peters.

### 4.2 Inoculação de plantas de soja (*Glycine max* L.) com *M. javanica*

Sementes da linhagem de soja resistente PI 595099 (PI) e da cultivar BRSMG 250 (Nobreza) foram semeadas em areia previamente esterilizada, por meio da tríplice autoclavagem, a 120°C, por 30 minutos e umedecidas com água. Em seguida, as bandejas foram colocadas em câmara climatizada com 16 horas de luz e à temperatura de 27±2°C, para permitir a germinação. Após 72 horas, as plântulas foram transplantadas para tubetes contendo 300 mL de substrato estéril (2 terra: 1 areia). Oito dias após o transplante, inocularam-se 500 J<sub>2</sub> de *M. javanica* por planta. Raízes de três plântulas inoculadas e não-inoculadas (controles *mock*) foram coletadas de cada genótipo nos seguintes tempos após a inoculação: 24, 48, 96, 144 e 192 horas.

### **4.3 Análise microscópica da penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* em raízes de soja**

Nos mesmos tempos mencionados anteriormente, foram coletadas raízes para monitorar a penetração e o desenvolvimento do juvenil. Cinco plantas de cada tratamento foram mantidas até 45 dias, para avaliação do número de galhas e massas de ovos. Para a população total foi realizada a extração conforme item 4.1. Para a contagem dos juvenis, massas de ovos e galhas foi utilizado corante alimentício, conforme técnica de Rocha et al. (2005). A fotodocumentação foi realizada com o auxílio de lupa, marca Tecnival, com aumento de 30 vezes. Para cada tempo após a inoculação, as raízes foram coletadas inteiras e imediatamente submetidas à coloração. Sob microscópio estereoscópico, nas raízes coradas, foram avaliados o número e o estágio de desenvolvimento dos juvenis de *M. javanica*.

### **4.4 Avaliação e análise dos dados**

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por período. Os dados relativos ao número de juvenis no interior das raízes foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR (Ferreira, 2000). As médias foram comparadas pelo teste Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Monitoramento da penetração e desenvolvimento do juvenil de *M. javanica* em raízes de soja

A penetração e o subsequente desenvolvimento de  $J_2$  de *M. javanica* nas raízes foram afetados pelos genótipos de soja (Figura 1). Em 48 horas após inoculação (h.a.i), o número de  $J_2$  nas raízes dos genótipos Nobreza e PI 595099 diferiram significativamente, com maior número de  $J_2$  no interior das raízes do genótipo suscetível.

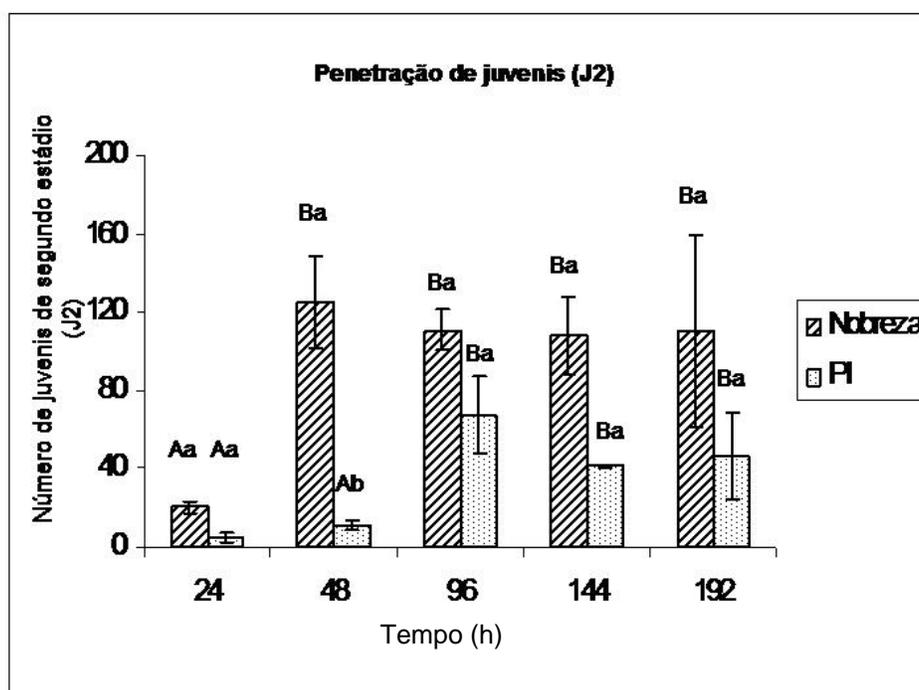


FIGURA 1 Número de  $J_2$  penetrados nos períodos de 24, 48, 96, 144 e 192 h.a.i. de 500  $J_2$ , por planta. Letras maiúsculas representam o desdobramento do tempo dentro de cada cultivar e as letras minúsculas o desdobramento entre os tempos. Barras seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Nas raízes de PI 595099, o maior número de J<sub>2</sub> no interior da raiz ocorreu às 96 h.a.i. Em geral, em todos os tempos analisados (24, 48, 96, 144 e 192 h.a.i.), observou-se maior penetração de J<sub>2</sub> na cultivar Nobreza.

O desenvolvimento dos juvenis foi evidenciado na cultivar Nobreza, com um grande número de formas salsichoides (terceiro e ou quarto estádios), às 144 h.a.i., enquanto que neste mesmo período no genótipo resistente PI 595099 observaram-se juvenis filiformes (segundo estágio) (Figura 2).

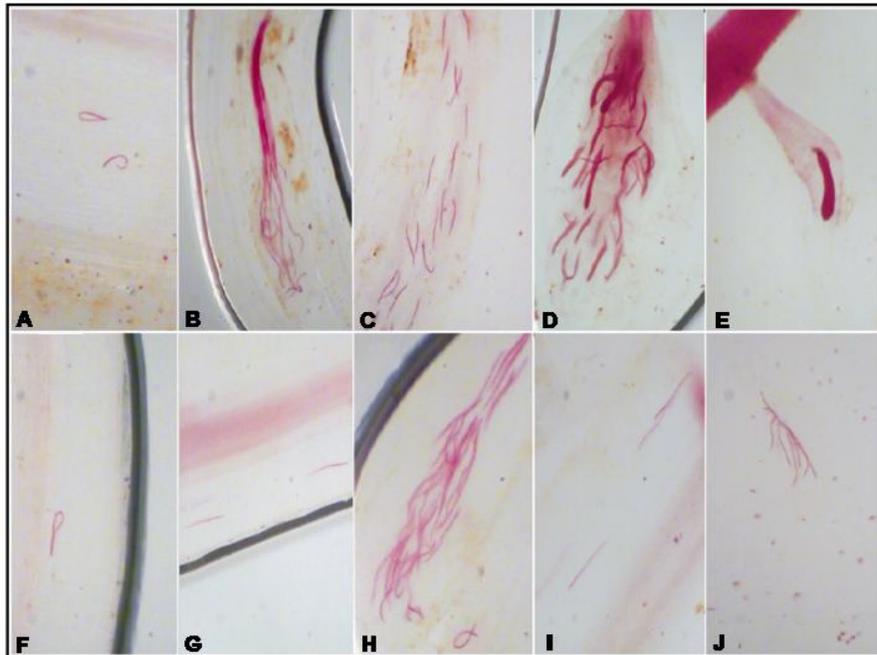


FIGURA 2 Micrografias de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* em raízes de soja PI 595099 e 'Nobreza', após 24, 48, 96, 144 e 192 horas após a inoculação (h.a.i). Os juvenis foram corados com corante alimentício. A: 'Nobreza' após 24 h.a.i.; B: 'Nobreza' após 48 h.a.i.; C: 'Nobreza' após 96 h.a.i.; D: 'Nobreza' após 144 h.a.i.; os juvenis estão salsichoides e apresentam coloração bem acentuada; E: 'Nobreza' após 192 h.a.i.; nesta micrografia já se pode visualizar uma fêmea em pleno desenvolvimento; F: PI após 24 h.a.i.; G: PI após 48 h.a.i.; H: PI após 96 h.a.i.; I: PI após 144 h.a.i., os juvenis se encontram pouco corados e J: PI após 192 h.a.i., os juvenis se apresentam porosos e ainda na forma filiforme. Aumento de 30 vezes.

Às 192 h.a.i. ocorreram a formação de células gigantes e o crescimento dos juvenis na cultivar Nobreza. Em geral, após 144 horas, a maioria dos juvenis mostrava-se filiforme, porosa e pouco corada no genótipo resistente (Figura 2a). Somente em uma das repetições, no genótipo PI 595099, foram encontrados juvenis salsichoides e fêmeas com a presença de células gigantes em 192 h.a.i.

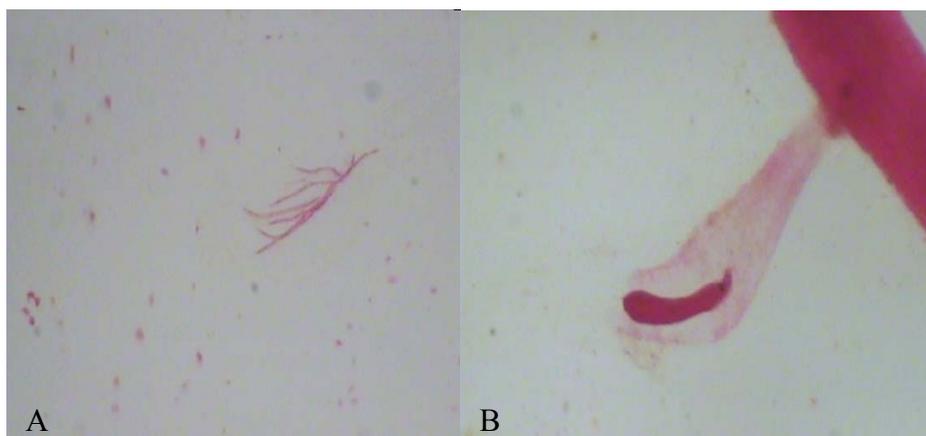


FIGURA 2a. Micrografias ampliadas de juvenis após 192 h.a.i. A: PI 595099 e B: 'Nobreza'. Aumento de 30 vezes.

## 5.2 Desenvolvimento de *M. javanica* em raízes de soja resistentes e suscetíveis, após 45 dias da inoculação com J<sub>2</sub>

Os resultados do número de galhas e massas de ovos, assim como da população total (ovos e juvenis), encontram-se nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas entre os genótipos, tendo a cultivar Nobreza apresentado maior número galhas e massas de ovos por miligrama de raiz e, conseqüentemente, maior número de ovos e juvenis extraídos.

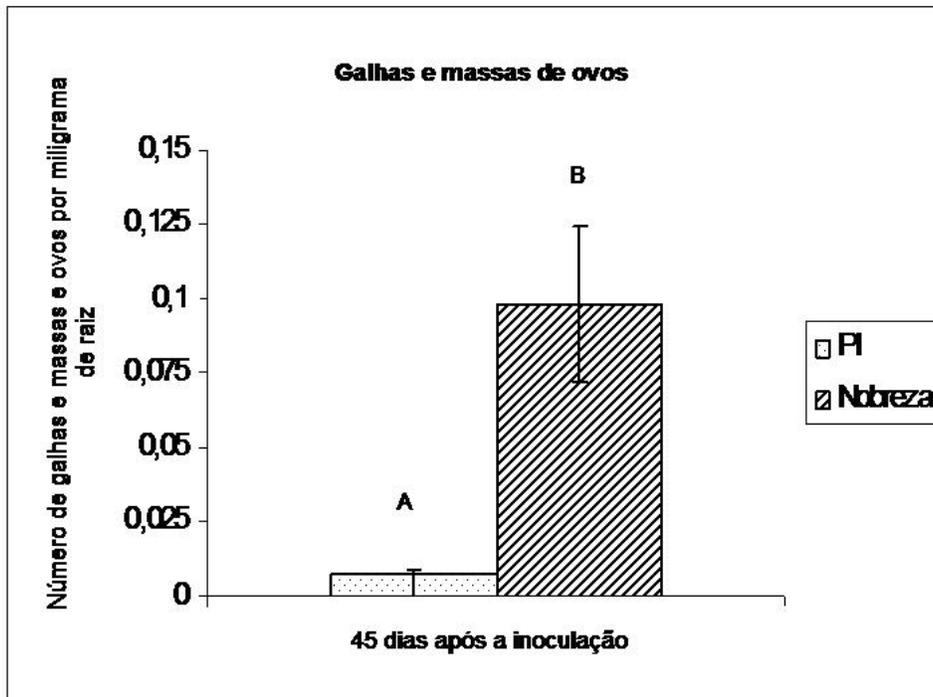


FIGURA 3 Número de galhas e massas de ovos por mg de raiz, após 45 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

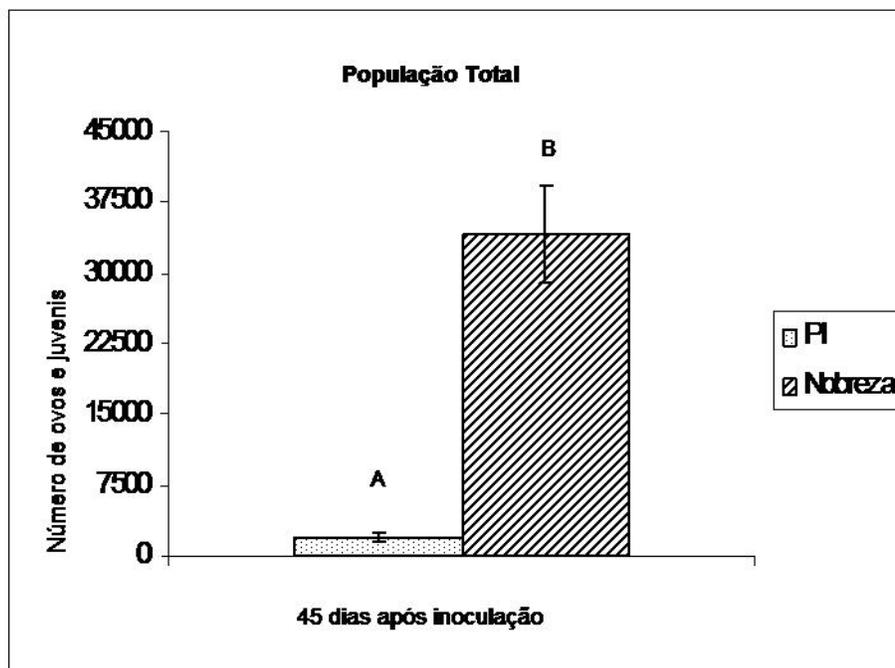


FIGURA 4 Número de juvenis e ovos (população total) após 45 dias de inoculação. Barras seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

A formação de galhas e de massas de ovos aos 45 dias da inoculação foi estatisticamente maior no genótipo suscetível, comparado ao resistente (Figuras 5 e 5a). A baixa formação de galhas e massas de ovos encontrada em PI 595099 indica que houve uma barreira que limitou o pleno desenvolvimento do nematoide nas raízes desse genótipo. No detalhe da Figura 5, a seta indica galha no genótipo suscetível (Nobreza).

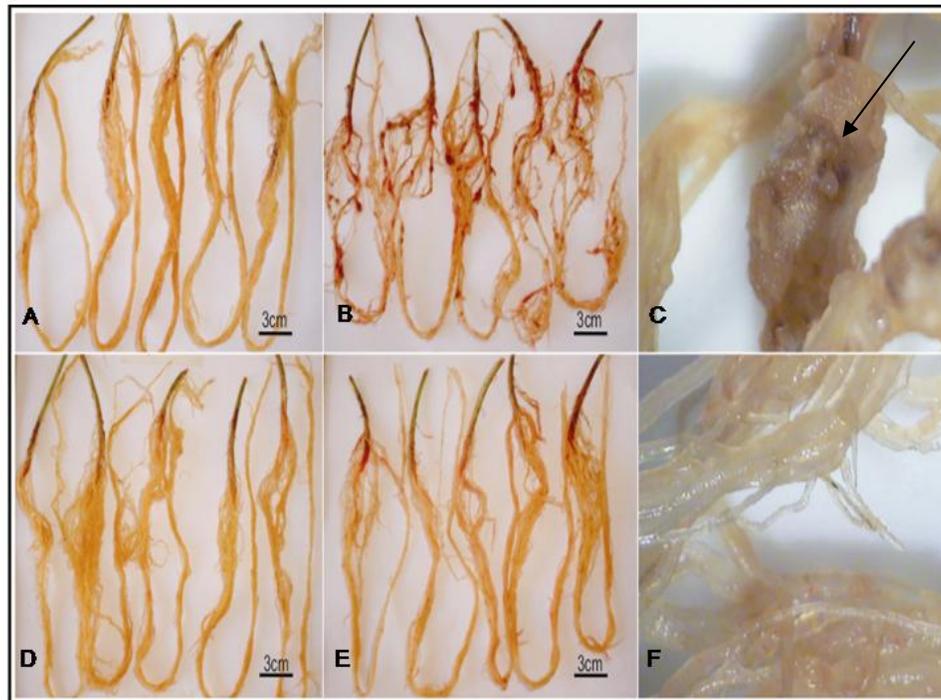


FIGURA 5 Micrografias de raízes de PI 595099 e de 'Nobreza', não inoculadas e inoculadas com J<sub>2</sub> de *M. javanica*, após 45 dias de inoculação. A: raízes de 'Nobreza' não inoculadas; B: raízes de 'Nobreza' inoculadas, nas quais se verifica grande número de galhas desenvolvidas; C: detalhe em lupa de galha na cultivar Nobreza; D: raízes não inoculadas de PI; E: raízes inoculadas de PI, mostrando poucas galhas; F: detalhe das raízes de PI inoculadas, não sendo possível identificar a formação de galhas.

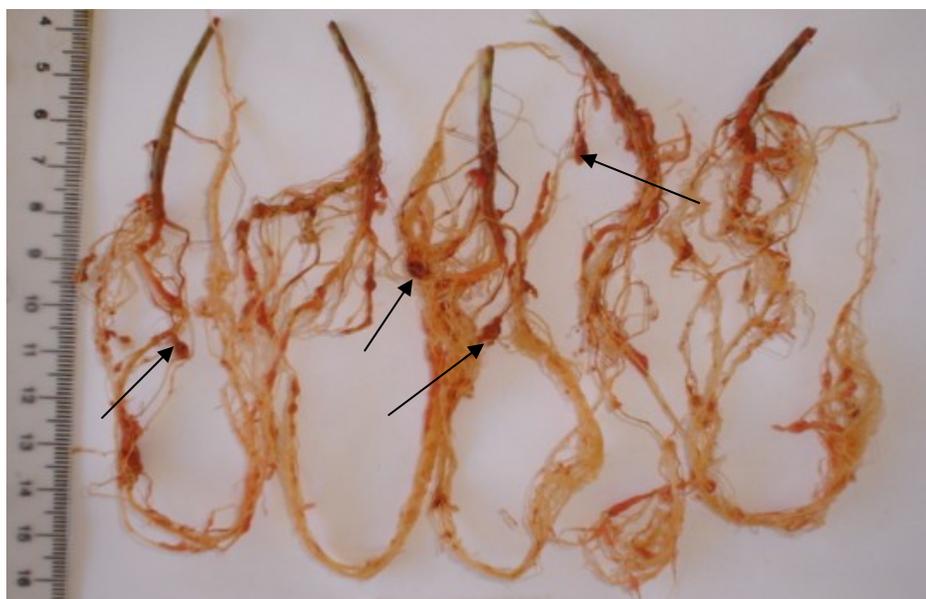


FIGURA 5a. Detalhe da formação das galhas na cultivar Nobreza, após 45 dias da inoculação. As raízes foram coradas com corante alimentício. As setas indicam as galhas.

Este trabalho demonstra a caracterização da penetração e o desenvolvimento de *M. javanica* em raízes da linhagem de soja resistente PI 595099 e na cv. suscetível Nobreza, durante 24, 48, 96, 144 e 192 h.a.i. A resistência da linhagem PI 595099 não é uma resistência à penetração de *M. javanica*, mas sim ao desenvolvimento dos juvenis, levando a uma baixa formação de galhas e massas de ovos. Resultados semelhantes foram encontrados em PI 96354 e PI 417444, genótipos de soja altamente resistentes a *M. incognita* (Herman et al., 1991). Outros estudos que caracterizam a resistência por meio de taxas de desenvolvimento e reprodução de *M. javanica* foram realizados em feijão (Sharma, 2005), maracujá (Sharma et al., 2002),

milho (Manzontte et al., 2002; Medeiros et al., 2001), banana (Cofcewicz et al., 2004) e cana-de-açúcar (Dinardo-Miranda et al., 2003).

Os mecanismos que conferem resistência da soja a *M. javanica* são ativados somente após a penetração do J<sub>2</sub> (Campos, 2003), sugerindo que os mesmos agem impedindo o desenvolvimento normal dos nematoides e a formação de galhas nos genótipos resistentes.

A resistência pode decorrer antes que o nematoide penetre na planta, incluindo, nessa categoria, o efeito nematicida presente no exsudato radicular das plantas, como o  $\alpha$ -Tertienil, a nimbidinae o pirocatecol (Huang, 1985). Em geral, em outras espécies de plantas, podem ocorrer, em seus exsudatos, tanto o efeito nematicida quanto ao efeito nematostático, levando os juvenis de *Meloidogyne* spp. à morte ou reduzindo sua mobilidade (Gommers, 1981; Campos et al., 2002).

Exsudatos radiculares de soja utilizados na incubação de J<sub>2</sub> de *M. incognita* tiveram importante papel na diminuição da infecção e menor formação de galhas em tomateiros (Rocha et al. 2004). No presente estudo, foi observada maior penetração de J<sub>2</sub> de *M. javanica* em ‘Nobreza’ e um atraso da penetração em PI 595099, sugerindo que os exsudatos liberados pelas raízes do genótipo resistente, provavelmente, interferiram no tempo e no número de juvenis encontrados nessas raízes.

Observações realizadas por Herman et al. (1991), em genótipos de soja altamente resistentes, resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne* sp., mostraram que houve maior penetração no genótipo de soja suscetível e um desenvolvimento desses juvenis a partir do sexto dia após a inoculação. Grande número de juvenis salsichoides (terceiro e ou quarto estádios) estava presente no genótipo suscetível e em número reduzido nos genótipos resistente e altamente resistente. O número de juvenis em desenvolvimento aumentou com o passar do tempo no genótipo suscetível, em número 10 vezes maior quando comparado

com o genótipo resistente e uma elevada emigração de juvenis foi observada nas raízes do genótipo resistente, após 16 dias de inoculação.

No genótipo suscetível ('Nobreza') observou-se grande número de juvenis de terceiro e ou quarto estádios, no período de 144 h.a.i. e alimentado por intermédio de células gigantes em 192 h.a.i.

No genótipo resistente PI 595099 foram encontrados juvenis ainda filiformes (segundo estádio), porosos, pouco corados e, provavelmente, mortos por privação alimentar. Provavelmente, na PI, houve emigração de juvenis no período de 96 h.a.i., culminando com um menor número de juvenis penetrados nos tempos seguintes. Houve exceção de apenas uma repetição, em que observaram-se juvenis mais desenvolvidos e formação de células gigantes. A porosidade encontrada, provavelmente, se refere a um nível baixo na concentração lipídica corporal desses juvenis (Rocha, 2007).

A resistência de plantas a nematoides pode ocorrer em duas fases: determinativa e expressiva (Kaplan & Davis, 1987). A primeira envolve a detecção do nematoide pelas células da planta, numa reação do tipo elicitor-receptor. O elicitor é, provavelmente, produzido na glândula esofagiana do nematoide. A fase expressiva inclui uma sucessão de eventos de regulação gênica e modificações bioquímicas que foram iniciados com o processo de sinalização, prevenindo o desenvolvimento do nematoide. Nessa fase, não há a formação normal do sítio de alimentação, que se degenera. Dessa forma, poucos nematoides se desenvolvem até a fase adulta, podendo ocorrer maior formação de machos e, quando eventuais fêmeas reproduzem, o fazem com taxas mais baixas de fecundidade (Silva, 2001).

A menor formação de galhas e massas de ovos observada na PI 595099 indica que, possivelmente, houve um desenvolvimento anormal, tanto no sítio de alimentação como dos juvenis. Os juvenis que se desenvolveram, ainda que poucos, o fizeram com baixa taxa de fecundidade, formando poucas galhas e

massas de ovos. A demonstração de que células gigantes produzidas em soja resistente a nematoides sofrem colapso e morrem foi realizada por Veech & Endo (1970).

A resistência e a suscetibilidade de plantas referem-se à habilidade evidenciada na supressão do desenvolvimento e da reprodução das espécies de nematoides. Plantas altamente resistentes possibilitam taxas de reprodução muito restritas dos parasitos, ao passo que as suscetíveis permitem abundante reprodução. Em soja, existe um gradiente em relação a essas duas características, com genótipos apresentando reações intermediárias entre os extremos (Silva, 2001). A caracterização genética da resposta de defesa do genótipo de soja resistente PI 595099, após a penetração de juvenis, possibilitará um maior entendimento dos fatores envolvidos nessa reação de defesa e de sua provável similaridade com a resistência a nematoides apresentada por outras plantas.

Capítulo transformado em artigo e submetido à revista *Tropical and Plant Pathology*, sob o título

“Histopathological aspects of root-knot nematode penetration and resistance in soybean genotypes”

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R. ; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da soja (*GlycIn::e Max L.*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

ASMUS, G. L.; Danos causados à cultura da soja por nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas Meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 39-62.

BOERMA, D.; HUSSEY, R. S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 24, p. 242-252, 1992.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, 1981. (Resumo).

CAMPOS, H. D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycIn::es*)**. 2003. 201 p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; RIBEIRO, L. O.; CAMPOS, J. R. Efeito de exsudato radicular de *Brachiaria decumbens* sobre a eclosão e mobilidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 185-186. 2002. (Resumo).

COFCEWICZ, E. T.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CORDEIRO, C. M. T.; QUÉNÉHERVÉ, P.; FARIA, J. L. C. Reação de cultivares de bananeira a diferentes espécies de nematóides das galhas. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 11-22, 2004.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue culture**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, A. A.; MENEGATTI, C. C. Danos causados por nematóides a variedades de cana-de-açúcar em cana planta. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 69-73, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A soja**.

Disponível em:

<[www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=22&cod\\_pai=16](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16)>. Acesso em: 05 jan. 2009.

FERRAZ, L. C. C. B. As Meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas Meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 15-34.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 225-258.

GOMMERS, F. J. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. **Helminthological Abstracts**, Wallingford, v. 50, p. 9-21, 1981.

HERMAN, M.; HUSSEY, R. S; BOERMA, H. R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 23, n. 2, p. 155-161, 1991.

HUANG, J. S. Mechanics of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Caroline State University Graphics, 1985. v. 1, p. 165-174.

KAPLAN, D. T.; DAVIS, E. L. Mechanisms of plant incompatibility with nematodes. In: VEECH, J. A; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 267-276.

MANZOTTE, U.; DIAS, W. P.; MENDES, M. de L.; SILVA, J. F. V. da; GOMES, J. Reação de híbridos de milho a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 105-108, 2002.

MEDEIROS, J. E.; SILVA, P. H.; BIONDI, C. M.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R.. Reação de genótipos de milho ao parasitismo de

*Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 243-245, 2001.

ROCHA, F. da S. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp.** 2007. 148 p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROCHA, F. S.; MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P. Coloração de fitonematóides com corantes na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 293-297, 2005.

ROCHA, F. da S.; CAMPOS, V. e P.; SOUZA, R. M. de. Efeito de exsudatos radiculares em endósporos de *Pasteuria penetrans* e em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne In: cognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 644-650, 2004.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHARMA, R. D. Susceptibilidade de genótipos de feijão Mungo Verde aos nematóides *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* no campo. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 87-89, 2005

SHARMA, R. D.; JUNQUEIRA, N. T.; GOMES, A. C. Reaction of passionfruit varieties to the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 93-96, 2002.

SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2001. p. 95-127.

SILVA, J. F. V.; FERRAZ, L. C. C. B.; ARIAS, C. A. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. **Nematropica**, Bradenton, v. 31, n. 2, p. 209-217, 2001.

VEECH, J. A.; ENDO, B. Y. Comparative morphology and enzyme histochemistry of root-knot resistance and susceptible soybean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 896-902, 1970.

YORINORI, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Fundação MT, 2000. p. 165-169.

## CAPÍTULO 3

### Mudanças na expressão de genes em soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica*

#### 1 RESUMO

LOPES, Marcus José Conceição. Mudanças na expressão de genes em soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica*. In: \_\_\_\_\_. **Aspectos histopatológicos e mudanças na expressão de genes em genótipos de soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica*** Cap. 3, 2009. p. 50-90. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.\*

A soja cultivada é uma espécie importante para o agronegócio brasileiro, gerando divisas para o país. Porém, muitos fatores limitam sua produção, com destaque para o ataque por fitonematoides de galha, causadores de enormes prejuízos para a cultura. O estudo dos mecanismos de resistência utilizados pelas variedades de soja resistentes a esses patógenos é de extrema importância. Por isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a resistência da linhagem de soja PI 595099 ao nematoide *Meloidogyne javanica*, por meio da análise da expressão gênica. Para tanto, duas bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de um mix de RNA de raízes de soja resistente não inoculadas e inoculadas com 500 juvenis de segundo estágio de *M. javanica*, nos períodos de 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 192 horas. Cerca de 800 *ESTs* (etiquetas de sequências expressas) foram sequenciadas e agrupadas em 195 clusters (79 contigs e 116 singletons). Onze genes diferencialmente expressos foram encontrados por meio de subtração *in silico*, os quais codificam proteína como metalotioneína, proteína reprimida pela auxina (*arp*), *SLAH1*, *SLAH4*, *zinc finger*, tioredoxina e fator de transporte nuclear (NTF-2), foram expressos e, provavelmente, envolvidos na resistência da PI. Outros genes encontrados somente em raízes de PI inoculadas merecem destaque, como N-

---

\* Comitê orientador: Luciano Vilela Paiva (UFLA-Orientador), Magnólia de Araújo Campos (UFCEG), Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

metiltransferase, glutathione transferase, NADH-ubiquinone oxidoreductase, kinesin, chalcone reductase, MADS-box proteins, MYB transcription factor, protein containing the NAC domain and protein containing the SAP domain. Among the transcripts found in non-inoculated roots are those that encode proteins involved in plant stress response, including serine/threonine kinase, possible trypsin inhibitor of the Kunitz type, protease inhibitor of the cysteine type, ethylene responsive protein and metallothionein. The role of genes found in the resistance of the PI soybean genotype to *M. javanica* is discussed.

## 2 ABSTRACT

LOPES, Marcus José Conceição. Changes in gene expression within resistant soybean during interaction with *Meloidogyne javanica*. In: \_\_\_\_\_. **Histopathological aspects and changes in gene expression within resistant soybean genotypes during interaction with *Meloidogyne javanica***. Cap. 3, 2009. p. 50-90. Thesis (Doutorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.\*

Soybean is a very important crop for the Brazilian agribusiness. However, many factors can limit the soybean production, especially root-knot nematode attack leading to severe damages to the culture. The studies about the resistance mechanisms elaborated by the resistant soybean phenotypes against these nematodes have very interest for breeders. For these reason, the objective of this work was to study the resistance from soybean line PI 595099 to *Meloidogyne javanica*, by using gene expression analysis. Then, two cDNA libraries were constructed using a pool of RNA from PI 595099 roots, inoculated and non-inoculated with 500 juveniles of second stage (J<sub>2</sub>) of *M. javanica*, collected at 6, 12, 24, 48, 96, 144 and 192 h.a.i. About 800 ESTs (expressed sequence tags) were sequenced e clustered into 195 clusters. Based on *in silico* subtraction analysis, eleven differentially expressed genes were found encoding putative proteins sharing amino acid sequence similarities by Blastx to metallothionein, SLAH4 (SLAC1 Homologue 4), SLAH1 (SLAC1 Homologue 1), Zinc finger, AN1-type; A20-type, Auxin-repressed protein, Thioredoxin and Nuclear transport factor 2 (NTF-2) proteins. Several other genes were also found in soybean root only under nematode-stressed conditions including NAC domain-containing protein MADS-box protein SOC1 (protein suppressor of constans overexpression 1), thioredoxin-like protein 4-Coumarate--CoA ligase, Transcription factor MYBZ2. In a different way, among genes expressed only in non-stressed roots of PI 595099 were found Ser/Thr protein kinase, Wound-induced basic protein, Ethylene-responsive family protein, Metallothionein-like protein Cysteine proteinase inhibitor (Cystatin) Putative Kunitz trypsin protease inhibitor. The putative roles that these genes are playing in resistance of the soybean genotype PI 595099 to *M. javanica* are discussed.

---

\* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva-UFLA (Major professor), Magnólia de Araújo Campos (UFCG), Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

### 3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das mais importantes oleaginosas do mundo, com produção, em 2006, da ordem de 221,5 milhões de toneladas, em todo mundo (FAO, 2008). Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial de soja, atrás somente dos Estados Unidos, com produção estimada, para a safra de 2008/2009, da ordem de 60 milhões de toneladas, representando 6,77% das exportações brasileiras, movimentando um montante de 9,3 bilhões de dólares (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, 2009, Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, 2009).

A infestação por fitonematoides representa um importante fator de limitação na produção de soja no país e no mundo, com destaque para o nematoide do cisto da soja (genêro *Heterodera*) e os nematoides de galhas (Gênero *Meloidogyne*) (Almeida et al., 2005), causadores de perdas agrícolas que chegam a 12,3% da produção, com prejuízo de 125 bilhões de dólares (Sasser & Freckman, 1986; Chitwood, 2003). No Brasil, os prejuízos são da ordem de 52,2 milhões de dólares anuais (Yorinori, 2000).

Dentre as principais espécies do gênero *Meloidogyne* que mais limitam a produção de soja no Brasil estão *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, as quais parasitam um grande número de espécies daninhas, o que dificulta seu controle (Almeida et al., 2005). A linhagem de soja PI 595099 foi desenvolvida pela *Georgia Agricultural Experiment Station* (EUA), possuindo resistência aos nematoides de galha *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, ao nematoide do cisto da soja *H. glycines* (raças 3 e 14) e resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines* (Silva et al., 2002). Essa linhagem também possui também resistência moderada ao afídeo *Aphis glycines* Matsumura, com redução de ninfoposição (Hesler et al., 2007). Considerando que o plantio de variedades resistentes se apresenta como um método seguro e prático para o controle de

fitonematoides, torna-se imprescindível o conhecimento acerca de respostas que a soja desenvolve quando atacada por nematoides do gênero *Meloidogyne*. O acúmulo de conhecimentos sobre a interação planta-patógeno contribui para a obtenção de variedades resistentes ao ataque de fitonematoides e mais adaptados à nova dinâmica mundial de sustentabilidade dos recursos ambientais. Desse modo, o conhecimento de genes expressos diferencialmente durante o processo de infecção poderá auxiliar a elucidar os mecanismos de respostas da soja que levam à resistência a *Meloidogyne*.

A identificação de genes induzidos no genótipo resistente PI 595099 inoculado por *Meloidogyne* pode levar ao estabelecimento de genes candidatos, que podem ser utilizados como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético ou no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, agregando características desejadas. Diante da relevância desses aspectos, neste trabalho foi relatado o perfil de expressão de 195 clusters de soja, obtidos por meio de bibliotecas de cDNA de raízes de soja, o que permite uma análise parcial da expressão gênica por meio de uma subtração *in silico* entre duas bibliotecas de cDNA, inoculadas com *Meloidogyne javanica* e não inoculadas. Possíveis funções para os produtos dos genes diferencialmente expressos são discutidas neste capítulo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo de juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) provenientes de casa de vegetação e infestadas com ovos de *M. javanica* foram previamente lavadas com água e cortadas em pedaços de, aproximadamente, 1 cm de comprimento. Posteriormente, as raízes foram liquidificadas por 50 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (Boneti & Ferraz, 1981). Em seguida, foram adicionados 2 g de caulim por tubo da centrífuga (50 mL), realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos utilizando-se pisseta com água destilada. Os ovos foram transferidos para uma câmara de eclosão construída com funil de vidro e papel de espessura fina. A eclosão ocorria em temperatura ambiente e os juvenis (J<sub>2</sub>) eram retirados na parte inferior do tubo de vidro com a realização da troca da água. Os juvenis eram reunidos em béqueres diferentes, de acordo com os dias. Após uma análise da viabilidade desses juvenis, o número total de juvenis viáveis para a realização desse bioensio foi reunido de três dias diferentes de coleta. A viabilidade foi medida pela motilidade desses juvenis, ou seja, foram considerados viáveis somente os juvenis que permaneciam constantemente em movimento.

### 4.2 Inoculação de plantas de soja (*Glycine max* L.) com *M. javanica*

As sementes provenientes da Embrapa Soja (linhagem de soja resistente PI 595099) e Epamig Uberaba (cultivar BRSMG 250, Nobreza), foram semeadas em areia previamente esterilizada, por meio da tríplice autoclavagem, a 120°C, por 30 minutos e irrigadas com água destilada. Para a germinação das plântulas, as bandejas foram colocadas em sala climatizada com fotoperíodo de

16 horas de luz, à temperatura de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após três dias de sala climatizada, as plântulas germinadas foram transplantadas para tubetes contendo 300 mL de substrato estéril (2 terra:1 areia), tratado com brometo de metila.

Oito dias após o transplante, foram inoculados 500 J<sub>2</sub> de *M. javanica* por plântula. Para a inoculação foi utilizada pipeta automática de 5 mL, com a suspensão de juvenis sob constante agitação. Raízes de ambos os genótipos inoculadas e não-inoculadas (controles *mock*) foram coletadas em cinco repetições nos seguintes tempos após a inoculação: 0, 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 192 horas.

### **4.3 Isolamento de RNA de raízes de soja infectadas com *M. javanica***

#### **4.3.1 Extração de RNA total (Método Trizol)**

Raízes de todos os períodos de coleta (uma por período), do genótipo de soja PI 595099, foram maceradas em nitrogênio líquido e colocadas em tubos de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de Trizol em cada tubo e agitou-se por 30 segundos. Os tubos permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram centrifugados, por 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  e a  $12.000 \times g$ . O sobrenadante foi coletado com auxílio de uma pipeta automática e transferido, onde permaneceu incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para promover a precipitação. Os tubos foram incubados por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugados, por 15 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  e a  $12.000 \times g$ . A fase aquosa foi removida com auxílio de uma pipeta automática e transferida para novo tubo (1,5 mL), onde foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol (álcool isopropílico) e 300  $\mu\text{L}$  de tampão citrato (livre de RNase) (0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M de NaCl). Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugados, por 15 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  e a  $12.000 \times g$ . Após descarte do

sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 75% (livre de RNase), mantendo-se uma agitação por 30 segundos, para lavar bem o precipitado e posterior centrifugação, por 5 minutos, a 4°C e a 8000 x g. O sobrenadante foi novamente descartado com inversão imediata do tudo sob papel filtro. O precipitado (*pellet*) foi seco em fluxo por, aproximadamente, 20 minutos e ressuspendido em 25 µL água Milli-Q tratada com DEPC. Para a observação da integridade do RNA total foi utilizado gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (Figura 1).

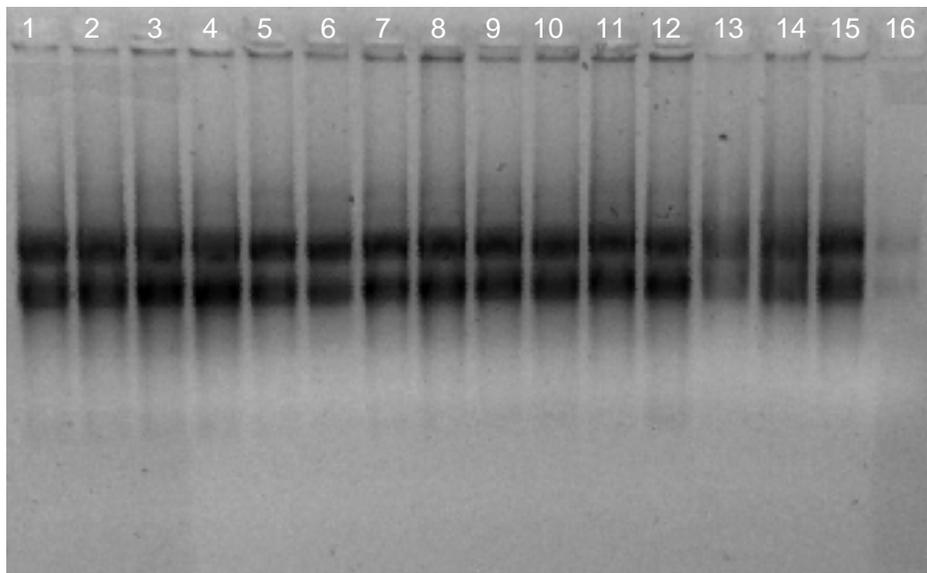


FIGURA 1 Gel de agarose 1,2%, mostrando o RNA total extraído de raízes de soja. Amostras 01 a 08 (PI inoculada) e amostras 09 a 16 (PI não inoculada).

#### 4.3.2 Limpeza do RNA

Para a limpeza do RNA total utilizou-se o *Kit RNeasy Mini Protocol for RNA cleanup* (Qiagen). Foram utilizadas duas colunas, uma para cada material, em cada tubo forma 350 µL de tampão RTL e 3,5 µL de β- mercaptoetanol. Após a homogeneização em vortex, foram acrescentados 250 µL de etanol

absoluto (temperatura ambiente) e as amostras foram agitadas gentilmente com auxílio de uma pipeta automática. A solução resultante (aproximadamente 700  $\mu$ L) foi transferida para a coluna e centrifugada, por 15 segundos (8000 xg). O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em tubo novo estéril, ao qual foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão RPE (contendo 4 volumes de etanol absoluto). O procedimento de lavagem foi repetido e a coluna foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 50  $\mu$ L de água livre de RNase. Essa operação foi repetida até que o volume final atingiu 100  $\mu$ L.

#### **4.4 Construção das bibliotecas de cDNA de raízes de soja inoculada com *M. javanica***

Foram construídas duas bibliotecas cDNA de soja (PI 595099 inoculada e não inoculada) a partir de RNA total, utilizando-se o *Clontech Creator SMART cDNA Library Construction Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizada uma sequência de oligo-dT modificada denominada CDSIII/3'PCR Primer, que insere a partir da inserção da cauda poli-A com a região codante. Ao alcançar a extremidade 5' do mRNA, a enzima acrescenta deoxi-citidinas na extremidade 3' do cDNA. Um oligonucleotídeo denominado SMART IV Oligo se anela às deoxi-citidinas na extremidade 5' do mRNA. O SMART IV Oligo possui uma sequência de guaninas na extremidade 3', formando, com a sequência de Cs, um molde estendido. Dessa maneira, foram gerados cDNAs de fita simples com extremidade 5' completas do mRNA, bem como uma sequência complementar ao SMART IV Oligo, servindo como sítio de iniciação universal (âncora SMART) para todas as amplificações. Os cDNAs foram fracionados em coluna de exclusão molecular e foram clonados no vetor pTriplEx 2 (FIGURA 2) do kit *SMART cDNA Library Construction*.

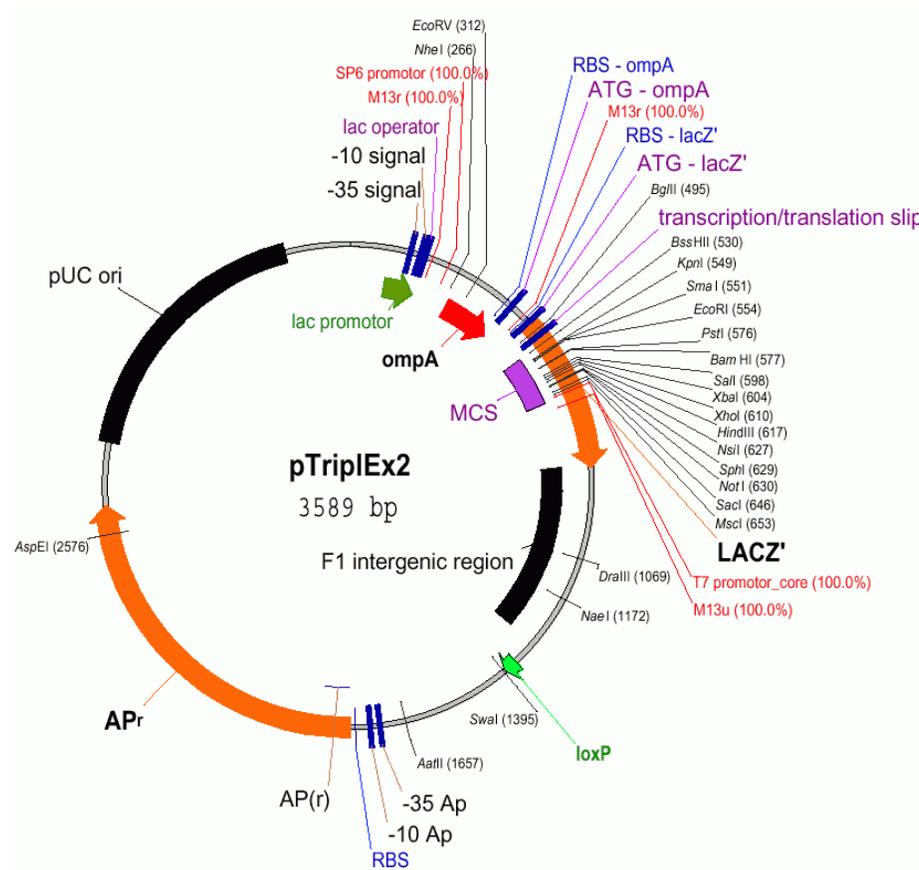


FIGURA 2 Mapa do vetor de clonagem pTriplEx2 do kit *Clontech Creator SMART cDNA Library Construction*.

O método de transformação utilizado foi o eletroporador MicroPulser da Bio-Rad e células *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Os transformantes foram selecionados em meio LB sólido com X-Gal/IPTG/Amp, nas concentrações finais 40 mg/mL, 0,25 mM/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. Os plasmídeos selecionados foram isolados por minipreparação de plasmídeos (Mini-Prep) pelo método de lise alcalina e os insertos de cDNA foram sequenciados a partir da extremidade 5', utilizando-se os *primers* específicos (PTR2

(5'CCGCATGCATAAGCTTGCTC3' (Reverse) e PTF2  
(5'GCGCCATTGTGTTGGTACCC3' (Forward).

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático (*Applied Biosystems Automated DNA Sequencer 3100 e 377*), pelo método dideoxy-terminator, utilizando-se o kit *BigDye terminator cycle Sequencing* (Applied Biosystems).

Para análise das sequências e subtração *in silico* foi utilizado o programa SisGen (Pappas et al., 2008), com diferenças significativas ( $p < 0,005\%$ ), nos testes estatísticos Stekel (Stekel, et al. 2000), Audic-Claverie (Audic & Claverie, 1997) e Fisher (Fisher, 1932). A anotação foi baseada no BlastX (Altschul et al., 1990), SwissProt (Bairoch & Apweiler, 1997) e KOG (*Clusters of Orthologous Groups of Proteins*) (Tatusov et al., 2003), segundo suas funções putativas. As sequências foram agrupadas em contigs.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Montagem e validação das ESTs

Com o objetivo de identificar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência da soja PI 595099 a *Meloidogyne javanica*, foram construídas duas bibliotecas de cDNA de raízes da PI, inoculada e não inoculada. Cerca de 2.112 clones foram sequenciados, dos quais 877 foram aceitos (41%), formando um total de 195 clusters, sendo 79 contigs (55 da PI inoculada e 24 contigs da PI não inoculada) (Tabelas 1, 2 e 3) e 116 singletons. Estas sequências foram depositadas no banco Genosoja, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Uma comparação *in silico* entre as duas bibliotecas contrastantes (PI inoculada e PI não inoculada com *M. javanica*) foi feita utilizando-se os critérios estatísticos de Stekel, Audic-Claveire e Fisher ( $p < 0,005$ ).

Onze contigs foram identificados com significativa variação na transcrição. Essas mudanças transcricionais podem ser resultado de um aumento nos níveis de transcrição ou de diminuição dos mRNAs, devido à presença do nematoide nas raízes. Nas condições estudadas, dez contigs foram encontrados com níveis de expressão significativa e diferencialmente aumentada e somente um contig (Contig7, sem homologia significativa no BLASTx) foi identificado com nível de expressão regulada para diminuição nas raízes de PI inoculada com *M. javanica*.

### 5.2 Identificação de genes de raízes de soja com significativa variação na transcrição durante interação com *M. javanica*

Neste trabalho, os genes significativamente expressos nas raízes da linhagem de soja PI 595099 estão envolvidos na síntese de proteína (60S ribossomal protein), regulação da interação célula/ambiente, defesa celular

(Metallothionein-like protein), comunicação celular/mecanismo de transdução de sinal (Zinc finger, AN1-type; A20-type) (Nuclear transport factor 2 (NTF-2)), metabolismo de resistência (Thioredoxin) e regulação hormonal (Auxin-repressed protein) e metabolismo celular (SLAH4 (SLAC1 Homologue 4), SLAH1 (SLAC1 Homologue 1), podendo estar envolvidos na resposta de defesa da PI ao nematoide (Tabela 1).

TABELA 1 Genes significativamente expressos em raízes da linhagem de soja resistente (PI 595999) inoculadas e não inoculadas com *M. javanica*.

Nome do Cluster	Testes estatísticos					Blast best hit
	PIN (115 reads)	PII (246 reads)	(p-values) Stekel	Audic-Claverie	Fisher	
Contig7	4	2	1,52	0,037	0,089	Hypothetical protein
Contig3	1	11	1,92	0,048	0,114	Metallothionein-like protein
Contig6	0	6		0,068	0,182	SLAH4 (SLAC1 Homologue 4)
Contig8	0	5		0,1	0,33	SLAH1 (SLAC1 Homologue 1)
Contig9	0	5		0,1	0,33	Zinc finger, AN1-type; A20-type
Contig1	1	7	0,81	0,164	0,44	Auxin-repressed protein
Contig4	4	6	0,14	0,252	0,732	Thioredoxin
Contig10	2	3	0,07	0,29	0,656	ACL098Cp
Contig16	1	5	0,35	0,291	0,669	Auxin-repressed protein
Contig2	3	10	0,24	0,3	0,762	Nuclear transport factor 2 (NTF-2)
Contig5	3	5	0,05	0,313	0,714	60S ribosomal protein
<b>11</b>	19	65	-	-	-	-

O gene *Metalotioneína* codifica uma proteína que representa uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular, apresentando, em sua estrutura molecular, 30% de cisteínas, cuja abundância de ligantes tiol confere às proteínas alta afinidade por íons metálicos (Inácio, 2006). Geralmente, é mais expressa em raízes e tem função associada à desintoxicação (homeostase) de metais como o zinco, cobre e cádmio, a fim de prevenir mutações celulares. Plantas que expressam a metalotioneína possuem tolerância a solos ricos em metais pesados e capacidade de mitigar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chiang et al., 2006). Devido a essa capacidade de reagir frente às ROS, está associada à resposta de hipersensibilidade (Wong et al., 2004).

Em folhas de arroz resistente ao fungo *Magnaporthe grisea*, a metalotioneína foi induzida (Kim et al., 2001). Em *Citrus sinensis* infectados com *Xylella fastidiosa*, a metalotioneína foi induzida em plantas com sintomas de clorose variegada (Souza et al., 2007), ao passo que, em *Citrus sinensis* inoculado com o vírus *Citrus leprosis*, essa proteína foi reprimida (Freitas-Astuas et al., 2007). Em raízes de amendoim (*Arachis stenosperma*) houve expressão da metalotioneína tipo 3 somente nas bibliotecas de raízes inoculadas com *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Proite, 2007). O gene *metalotioneína* encontrado expresso no genótipo resistente PI inoculado, provavelmente, está associado à reação de resposta de defesa, agindo diretamente na quebra de espécies reativas de oxigênio que, em excesso na célula, pode causar danos proteicos na parede celular e, até mesmo, em ácido nucleicos, em resposta ao ataque do nematoide.

O gene SLAC1 e seus homólogos estão associados à sensibilidade do CO<sub>2</sub> na regulação de trocas gasosas em células-guarda, tendo uma função conservada, em toda família SLAC1, de manter a homeostase de ânions orgânicos/inorgânicos na célula (Negi, et al., 2008). Os dois genes do tipo

SLAC1 (SLAH4 e SLAH1) encontrados expressos somente na biblioteca PI inoculada, possivelmente estão envolvidos numa alta regulação iônica, como um dos mecanismos de defesa desse genótipo de soja ao nematoide.

O gene que codifica a proteína ribossomal 60S também foi significativamente regulado em raízes estressadas por *M. javanica*. O aumento de sua expressão pode estar relacionado com um aumento na síntese proteica de genes envolvidos na resposta ao nematoide. Em *Poncirus trifoliata* foi observado um aumento de sua expressão após ser atacado pelo vírus da tristeza (Cristofani-Yaly et al., 2007). Um aumento de proteínas ribossomais também pode estar envolvido no processo de resistência apresentada pela PI, uma vez que pode estar relacionado à síntese de proteínas reguladas pela presença do nematoide.

Existem outros transcritos possivelmente induzidos em raízes de soja resistente pelo estresse causado por nematoide, tal como um gene que codifica proteínas contendo motivo do tipo dedos de zinco (*Zinc finger, AN1-type; A20-type*), pertencentes à superfamília de genes *SAP (Stress Associated Proteins)*, portanto, associados a estresses. Membros dessa família têm sido classificados de acordo com o número e a ordem de resíduos de cisteína e histidina ligadas ao íon zinco (Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008).

Essas proteínas do tipo dedos de zinco estão envolvidas na comunicação celular, em mecanismos de transdução de sinais (KOG3173), interagindo tanto com ácidos nucleicos quanto com proteínas, regulando papéis biológicos importantes, como desenvolvimento floral, morfogênese regulada pela luz e respostas a estresses bióticos e abióticos e morte celular programada (Takatsuji, 1998). *Zinc Finger* foi isolado em bibliotecas de cDNA de pimenteira estressada com altas temperaturas e também em diversos outros tipos de estresse em pimenta. A superexpressão de um gene *zinc finger* retirado de pimenta (*Capsicum annuum*) em fumo transgênico (*Nicotiana tabacum*) revelou plantas

com aumento do crescimento vegetativo, raízes primárias maiores, aumento do tamanho foliar e aumento do número de folhas, resultando no aumento do peso fresco das plantas adultas (Zeba et al., 2008).

Em bibliotecas de folhas de *Poncirus trifoliata* inoculadas com *Citrus tristeza virus* (CTV), ocorreu uma superexpressão de genes *zinc finger*, sugerindo uma importância desse gene na resposta ao estresse causado pelo vírus (Cristofani-Yaly et al., 2007). A expressão somente na PI inoculada pode indicar a ativação do metabolismo celular, na possível tentativa de reprimir o desenvolvimento dos juvenis penetrados.

Dois genes do tipo arp (*Auxin Repressed Protein*), que codificam proteínas reprimidas pelo fito-hormônio auxina, foram encontrados diferencialmente expressos em resposta da PI à inoculação com *M. javanica* (Tabela 1). Genes do tipo arp já foram descritos em morango (Reddy & Poovaiah, 1990), fumo (Steiner et al., 2003) e pimenta (Hwang et al., 2005)

Esses genes do tipo arp possuem sequências muito parecidas à dos genes de dormência, respondendo similarmente aos mesmos estímulos (Reddy & Poovaiah, 1990). Além disso, vários trabalhos demonstraram que a expressão de genes de dormência também é reprimida pela auxina (Reddy & Poovaiah, 1990; Brinkler et al., 2004; Shimizu et al., 2006). A expressão de genes arp está associada a diversos estresses, tais como estresse hídrico (Kohler et al., 2003), estresse salino e baixa temperatura (Hwang et al., 2005), em resposta à inoculação por fungos (Coram & Pang, 2006) e, inclusive, por nematoides (Alkharouf et al., 2004; Proite, 2007), dentre outros. Entretanto, pouco se conhece sobre os genes que são reprimidos pela auxina que desempenham funções importantes nas primeiras horas de infecção causada por nematoides da galha e do cisto (de Almeida-Engler et al., 1999).

Sabe-se que auxinas, especialmente o ácido indol-3-acético (AIA), regulam muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento, como dominância

apical, respostas de tropismo, formação de raízes laterais, diferenciação vascular, alongamento de brotos, divisão e diferenciação celular (Okushima et al., 2005). Considerando-se que auxina modula citocinina na formação de raízes laterais, fator importante para a penetração dos nematoides (Lohar et al., 2004), e que o acúmulo de auxina nas raízes é induzido por fitonematoides como estratégia de parasitismo, levando a uma maior indução da formação dos sítios de alimentação (Huntagura et al., 1999), elucidar a participação de genes do tipo *arp* diferencialmente expressos nas raízes de soja resistente em resposta a nematoide é de grande interesse.

É provável que a expressão de genes que reprimem auxina (*arp*) no genótipo resistente PI, quando atacado por *M. javanica*, deva levar a uma diminuição na emissão de raízes e isso poderia ser uma explicação para menores penetração de juvenis e desenvolvimento de galhas observados na PI inoculada com *M. javanica*. Entretanto, essa hipótese precisa ser experimentalmente comprovada.

Além desses, dois genes do tipo *Tiorredoxina* também foram encontrados somente em raízes de PI em resposta a *M. javanica*, sendo o nível de um deles considerado significativamente expresso. Tiorredoxinas estão envolvidas na regulação do ambiente redox da célula (Gelhay et al., 2005), em modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas (KOG0907). Compreendem uma família de pequenas proteínas de plantas, que contem seis diferentes tipos, quatro deles no cloroplasto (*F*, *M*, *X* e *Y*), *O* em mitocôndria e *H* no citoplasma. Dois novos genes que codificam tiorredoxinas encontrados em legume (*Medicago trunculata*) e denominados S e S para simbiose possuem potencial redox similar ao da tiorredoxina *M*, atuando como substrato para a NADP-Trx redutase (Alkhalifioui et al., 2008) e estão envolvidos no desenvolvimento e na germinação (Nuruzzaman, et al., 2008). Em espinafre e batata foram encontradas 50 proteínas ligadas a tiorredoxinas em 12 processos

funcionais, fotorrespiração, ciclo do ácido cítrico e reações associadas, metabolismo de lipídio, transporte de elétrons, síntese de ATP, transporte de membrana, tradução, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de enxofre, síntese de hormônio e relações associadas a estresse.

Ainda é sugerido que a tiorredoxina faça a comunicação entre mitocôndria e cloroplastos por intermédio de redes de transporte de metabólitos, como dihidroxiacetona fosfato, malato e glicolato. Nesse sentido, a absorção de luz pela clorofila regula processos fundamentais na mitocôndria por meio dessas redes de comunicação (Balmer, et al., 2004). Entretanto, foi demonstrado que tiorredoxina CITRX (*Cf-9-interacting binding thioredoxin*) interage com a proteína de resistência Cf-9 de tomate e age como regulador negativo da morte celular e das respostas de defesa induzidas por Cf-9, implicando na atividade de tiorredoxinas também na regulação de resistência de plantas a doenças (Rivas et al., 2004). A tiorredoxina diferencialmente expressa nas raízes de PI inoculada pode participar de um eventual aumento do metabolismo celular ou de alguma estratégia de defesa elaborada no genótipo resistente com a participação de algum gene *R*.

Transcritos representando genes com homologia a genes do tipo *Factor de Transporte Nuclear 2* foram significativamente aumentados em raízes de soja PI inoculadas com *M. javanica*. Em *Nicotiana benthamiana*, a superexpressão de um gene de fator de transporte nuclear 2 (*Nuclear Transport Factor 2*) (*IAtNF2a*) bloqueia o transporte nuclear dos fatores de transcrição e o excesso desse gene bloqueia a entrada de pequenas GTPases multifuncionais do tipo *Ran*, as quais têm como função transporte núcleo-plasmático, na formação do fuso mitótico e formação do envelope nuclear. Dessa forma, os genes que codificam para fatores de transporte nuclear 2 estão envolvidos no transporte de GTPases em plantas (Zhao et al., 2006). Uma vez que raízes de PI inoculadas com nematoide possuem cerca de três vezes mais o nível de expressão de genes

do tipo fator de transporte nuclear 2, em relação às não inoculadas, é possível que estes genes estejam contribuindo para uma eventual desorganização celular associada à resistência, em que poderia dar suporte ao afetado desenvolvimento de juvenil de *M. javanica* nestas raízes, demonstrado no Capítulo 2.

### **5.3 Identificação de genes expressos apenas em raízes de soja durante interação com *M. javanica***

Muitos genes relacionados com resposta de plantas a estresses foram encontrados somente em raízes de PI inoculadas com *M. javanica*, embora o nível de expressão dos mesmos não tenha sido considerado estatisticamente significativo em relação ao encontrado em raízes não inoculadas do mesmo genótipo (Tabela 2).

TABELA 2 Genes expressos em raízes da linhagem resistente de soja PI 595099 inoculada por *M. javanica*

Contig	Blast Best Hit	Organismo	Código de Acesso	E-value	Numero de		
					EST's	PII	Total
Contig1	Auxin-repressed protein-like protein, Positives = 48/72 (66%)	<i>Nicotiana tabacum</i>	<a href="#">AY183722.1</a>	1e-11	2	12	14
Contig2	Nuclear transport factor 2 (NTF-2), Positives = 113/124 (91%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp Q9C7F5.1 NTF2_ARATH</a>	7e-57	3	10	13
Contig3	Metallothionein-like protein 2 (MT-2)	<i>Cicer arietinum</i>	<a href="#">sp Q39459.2 MT2_CI_CAR</a>	5e-15	1	11	12
Contig4	Thioredoxin-like 4, Positives = 77/104 (74%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp Q8LDI5.2 TRXL4_ARATH</a>	4e-27	5	6	11
Contig5	60S ribosomal protein L23, Positives = 92/93 (98%)	<i>Zea mays</i>	<a href="#">gb ACG48540.1 </a>	5e-69	3	5	8
Contig6	SLAH4 (SLAC1 HOMOLOGUE 4) Positives = 134/176 (76%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_001077757.1 </a>	5e-49	0	7	7
Contig8	SLAH1 (SLAC1 HOMOLOGUE 1); transporter Positives = 79/113 (69%),	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_176418.2 </a>	2e-29	0	6	6
Contig9	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 8 (OsSAP8) Positives = 127/169 (75%)	<i>Oryza sativa</i>	<a href="#">sp A2YEZ6.2 SAP8_ORYSI</a>	8e-56	0	5	5
Contig10	ACL098Cp, Positives = 28/59 (47%)	<i>Ashbya gossypii</i>	<a href="#">ref NP_983306.1 </a>	2.7	2	3	5
Contig11	N-methyltransferase Positives = 133/160 (83%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_565246.1 </a>	8e-70	0	4	4
Contig13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 8 Positives = 148/148 (100%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">834173 UBC8</a>	2e-82	0	4	4

(...continua...)

TABELA 2, Cont.

Contig14	Probable glutathione S-transferase (Heat shock protein 26A) (G2-4), Positives = 56/57 (98%)	<i>Glycine max</i>	<a href="#">gb AAG34798.1 AF2_43363_1</a>	2e-25	0	4	4
Contig16 CL1Cont ig2	Auxin-repressed protein Positives = 69/131 (52%)	<i>Zea mays</i>	<a href="#">gb ACG37064.1 </a>	5e-13	1	5	6
Contig17	Probable aquaporin PIP-type 7a (Turgor-responsive protein 7 <sup>a</sup> , 31), Positives = 107/108 (99%)	<i>Medicago truncatula</i>	<a href="#">gb AAK66766.1 AF3_86739_1</a>	1e-54	0	3	3
Contig18	Histone-lysine N-methyltransferase ASHR1, Positives = 30/54 (55%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp Q7XJS0.2 ASHR1_ARATH</a>	6.1	1	2	3
Contig19	Auxin response factor 2 (ARF1-binding protein) (ARF1-BP) Positives = 49/57 (85%).	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<a href="#">gb ABC69711.1 </a>	9e-16	0	3	3
Contig20	Adenine phosphoribosyltransferase 1 (APRT 1), Positives = 164/174 (94%)	<i>Solanum tuberosum</i>	<a href="#">gb ABB86271.1 </a>	2e-81	0	3	3
Contig21	Acetyl-CoA carboxylase, alpha subunit Positives = 31/56 (55%)	<i>Flavobacterium sp. MED217</i>	<a href="#">ref ZP_01059904.1 </a>	34.7	0	3	3
Contig25	Chloroplast 50S ribosomal protein L14, Positives = 94/94 (100%).	<i>Glycine max</i>	<a href="#">ref YP_538801.1 </a>	5e-45	0	3	3
Contig33	Acyl carrier protein, mitochondrial precursor (ACP) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 9.6 kDa subunit) (MtACP-1), Positives = 79/120 (65%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp P53665.1 ACPM_ARATH</a>	9e-25	0	2	2
Contig34	Kinesin light chain 3 (Kinesin light chain KLCt) Positives = 122/137 (89%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">gb AAM63491.1 </a>	1e-54	0	2	2

(...continua...)

TABELA 2, Cont.

Contig35	Predicted protein Positives = 30/57 (52%)	<i>Pichia guilliermondii</i>	<a href="#">gb EDK41815.2 </a>	0.90	0	2	2
Contig36	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase, related Positives = 49/115 (42%)	<i>Medicago truncatula</i>	<a href="#">gb ABN08132.1 </a>	1e-06	0	2	2
Contig37	ATP synthase 6 kDa subunit, mitochondrial Positives = 20/23 (86%)	<i>Solanum tuberosum</i>	<a href="#">sp P80497.1 ATPY_S</a> <a href="#">OLTU</a>	4e-05	0	2	2
Contig38	Transcription factor MYBZ2 Positives = 131/131 (100%)	<i>Glycine max</i>	<a href="#">gb ABI73970.1 </a>	6e-119	0	2	2
Contig39	thioredoxin-like protein 1 Positives = 149/169 (88%)	<i>Zea mays</i>	<a href="#">gb ACG24478.1 </a>	1e-66	0	2	2
Contig41	No hit blast				0	2	2
Contig42	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1 (Defender against cell death 1) (DAD-1) (AtDAD1), Positives = 111/113 (98%),	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_174500.1 </a>	3e-52	0	2	2
Contig43	Anaphase-promoting complex subunit 11 (APC11) (Cyclosome subunit 11), Positives = 67/83 (80%)	<i>Mus musculus</i>	<a href="#">sp O9CPX6.1 APC11</a> <a href="#">MOUSE</a>	2e-36	0	2	2
Contig44	Unnamed protein product Positives = 39/54 (72%)	<i>Vitis vinifera</i>	<a href="#">embl CAO40176.1 </a>	5e-05	1	1	2
Contig46	Inner membrane magnesium transporter mrs2, mitochondrial precursor (RNA-splicing protein mrs2), Positives = 58/120 (48%),	<i>Schizosaccharo myces pombe</i>	<a href="#">sp P87149.1 MRS2_S</a> <a href="#">CHPO</a>	8e-05	0	2	2

(...continua...)

TABELA 2, Cont.

Contig48	F-box/LRR-repeat protein 16 (F-box and leucine-rich repeat protein 16) Positives = 131/144 (90%)	<i>Malus x domestica</i>	<a href="#">gb ACB87911.1 </a>	6e-57	0	2	2
Contig50	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform (G6PD) Positives = 89/93 (95%)	<i>Solanum tuberosum</i>	<a href="#">gb ABB55386.1 </a>	1e-44	0	2	2
Contig51	Hypothetical protein MtrDRAFT_AC136139g5v2, Positives = 35/38 (92%).	<i>Medicago truncatula</i>	<a href="#">gb ABE93033.1 </a>	8e-12	0	2	2
Contig52	USP family protein Positives = 27/30 (90%)	<i>Zea mays</i>	<a href="#">gb ACG42306.1 </a>	6e-06	0	2	2
Contig53	Unnamed protein product Positives = 111/119 (93%)	<i>Vitis vinifera</i>	<a href="#">emb CAO42347.1 </a>	6e-53	0	2	2
Contig54	39S ribosomal protein L41-A, mitochondrial precursor Positives = 79/89 (88%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_568574.1 </a>	8e-35	0	2	2
Contig57	Chalcone reductase Positives = 89/106 (83%)	<i>Sesbania rostrata</i>	<a href="#">emb CAA11226.1 </a>	3e-33	0	2	2
Contig58	Probable rhamnose biosynthetic enzyme 1 Positives = 94/103 (91%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp O9SYM5.1 RHM1_ARATH</a>	7e-46	0	2	2
Contig60	Ubiquinol--cytochrome-c reductase-like protein Positives = 83/85 (97%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">dbj BAD95225.1 </a>	5e-43	0	2	2
Contig61	Translation initiation factor IF-2 Positives = 39/80 (48%)	<i>Plasmodium yoelii</i>	<a href="#">ref XP_730210.1 </a>	3.0	0	2	2

(...continua...)

TABELA 2, Cont.

Contig62	UPF0497 membrane protein At2g28370, Positives = 49/55 (89%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp Q9SKN3.1 U4977_ARATH</a>	1e-20	0	2	2
Contig63	MADS-box protein SOC1 (protein suppressor of constans overexpression 1) Positives = 77/82 (93%)	<i>Glycine max</i>	<a href="#">gb ABC75835.1 </a>	3e-33	0	2	2
Contig64	SAP domain-containing protein Positives = 84/117 (71%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_201151.2 </a>	3e-22	0	2	2
Contig65	No blast hit	-	=	-	0	2	2
Contig66	Histone H2A.F/Z Positives = 115/116 (99%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">emb CAA73155.1 </a>	4e-54	0	2	2
Contig68	Hypothetical protein MGG_13574 Positives = 28/54 (51%)	<i>Magnaporthe grisea</i>	<a href="#">ref XP_001408018.1 </a>	5.9	0	2	2
Contig69	No significant	-	=	-	0	2	2
Contig70	Ferredoxin Positives = 102/118 (86%)	<i>Zea mays</i>	<a href="#">gb ACG39554.1 </a>	4e-43	0	2	2
Contig71	HMG1/2-like protein (Protein SB11) Positives = 119/121 (98%)	<i>Glycine max</i>	<a href="#">sp P26585.1 HMGL_SOYBN</a>	3e-33	0	2	2
Contig72	ABI5 binding protein A1 Positives = 47/54 (87%)	<i>Triticum aestivum</i>	<a href="#">dbj BAG12827.1 </a>	3e-25	0	2	2
Contig73	NAC domain-containing protein 29 (ANAC029) (NAC2) Positives = 64/102 (62%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp O49255.1 NAC29_ARATH</a>	2e-17	0	2	2
Contig74	At3g08610 Positives = 58/62 (93%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">gb AAP21180.1 </a>	4e-23	0	2	2

(...continua...)

TABELA 2, Cont.

Contig77	Metallo-beta-lactamase superfamily protein Positives = 48/105 (45%)	<i>Alcanivorax</i> sp.	<a href="#">gb EDX88588.1</a>	1.4	0	2	2
Contig79	4-Coumarate--CoA ligase-like 5 (Peroxisomal OPC-8:0-CoA ligase 1), Positives = 175/199 (87%).	<i>Oryza sativa</i>	<a href="#">sp Q10S72.1 4CLL4_ORYSJ</a>	2e-87	0	2	2
<b>55</b>	-	-	=	-	19	170	189

Entre estes genes foi encontrado um fator de transcrição MYB (Contig38) (KOG0048), que codifica uma proteína cuja família possui repetições de um domínio conservado de 50 resíduos de aminoácidos e regula o metabolismo de fenilpropanoides, importante resposta de defesa a patógenos. Nas plantas, estão localizadas em tecidos específicos e envolvidas em várias rotas biossintéticas, incluindo a produção de antocianinas e flavonoides (Paz-Ares et al., 1987).

Proteínas MYB de fumo podem ativar o gene que codifica a primeira enzima no metabolismo de fenilpropanoides, a fenilalanina amônia liase (PAL), havendo também evidências da participação das proteínas MYB como fator de transcrição, em sítios de ativação de promotores envolvidos tanto no metabolismo de fenilpropanoides quanto da biossíntese de lignina. Muitos compostos envolvidos na resposta de defesa das plantas são sintetizados na via biossintética de fenilpropanoides, como, por exemplo, a lignina e as fitoalexinas, cuja indução por ataque de patógenos pode levar a uma polimerização da parede celular, barreira primária de resistência ao patógeno (Dixon & Paiva, 1995). O fator de transcrição MYB pode estar interferindo indiretamente na resistência da parede celular da PI, de maneira a dificultar a penetração de juvenis e formando, assim, um menor número de galhas (ver capítulo 1).

Um importante gene que codifica uma proteína contendo domínio NAC, denominado *NAC domain* (definido por *NAM*, *ATAF1* e *CUC2* genes), foi encontrado expresso somente na biblioteca de PI inoculada (Contig73, Tabela 2). Os membros desta superfamília de proteínas possuem uma sequência de resíduos de aminoácidos conservados na porção N-Terminal da proteína chamado domínio NAC, que se parece com um domínio de ligação à DNA (Kikuchi et al., 2000). A família NAC codifica fatores de transcrição e são bem distribuídos no genoma de plantas e estão envolvidos no crescimento, no desenvolvimento, na senescência de plantas e, ainda, na resposta a ferimentos e

defesas contra patógenos (Fujiwara et al., 2004). Membros desta superfamília de fatores de transcrição do tipo NAC vêm sendo mais bem estudados em *Arabidopsis thaliana*.

O genoma de *A. thaliana* contém mais de 90 genes NAC domain preditos, os quais foram coletivamente chamados de *AtNAC*. Para o gene *AtNAC2* foi demonstrado que atua *downstream* nas vias de sinalização do etileno e de auxinas e que está envolvido na resposta a estresse salino e no desenvolvimento de raízes laterais (He et al., 2005). Por outro lado, outro gene *SND1* (de *Secondary wall-associated NAC Domain protein* = proteína NAC domain associada à parede secundária) é um elemento regulador chave da síntese de parede secundária em fibras de *A. thaliana*, cuja expressão ectópica levou a uma deposição massiva de parede secundária em células que, normalmente, não são esclerenquimatosas (Zhong et al., 2006).

O papel desse gene na resistência de PI a *M. javanica* precisa ser investigado, mas é possível que ele tenha sido induzido por etileno, em resposta ao ferimento, mais do que por auxinas. É possível, ainda, que esteja participando de fortalecimento de parede celular como mecanismo de resistência da PI frente à penetração subsequente de J<sub>2</sub> de *M. javanica*.

Transcritos de aquaporina do tipo *PIP* (*plasma membrane intrinsic protein*), um dos quatro grupos de aquaporinas de plantas, também foram encontrados somente em PI inoculada com *M. javanica*. Aquaporina é um canal de água que aumenta a permeabilidade nas membranas celulares e possui funções importantes na expansão celular e divisão celular (Okubo-Kurihara et al., 2009). Portanto, a indução na expressão de genes aquaporina está relacionada ao aumento da permeabilidade da membrana celular à água, quando esta se encontra com baixa disponibilidade (déficit hídrico). A expressão de genes *aquaporina* tem sido demonstrada associada também a estresses causados por pragas e patógenos. Isso pode ser observado em raízes de tomate inoculadas

com *Heterodera glycines* (Klink et al., 2005) e em folhas de arroz resistente a *Magnaporthe grisea* (Jantasuriyarat et al., 2005), indicando que aquaporinas exercem papel importante na resistência a esses micro-organismos. A presença de genes aquaporina do tipo PIP, associada à membrana plasmática, expressos somente em raízes de PI sob estresse de nematoide, pode indicar a existência nessas raízes de déficit hídrico, devido ao parasitismo e uma resposta de defesa com a participação de aquaporinas.

Além desses, vários outros genes envolvidos com defesa de plantas a estresses foram encontrados, tais como DAD1 protein (*defender against cell death 1*), MADS-box protein SOC 1 (*protein supressor of constans overexpression 1*), citocromo C redutase, SAP domain (*Stress Associated Proteins*), glutationa-S-transferase e aqueles que participam de vias metabólicas secundárias, tais como chalcone sintase e 4-coumarate-CoA. Seguramente, todos esses genes são relevantes na elucidação dos mecanismos de resposta de resistência da PI a *M. javanica*.

#### **5.4 Genes expressos apenas em raízes de soja não inoculadas com *M. javanica***

O estudo da expressão comparativa e diferencial de genes requer um controle (*mock control*) que retrate, da forma mais fidedigna possível, todas as condições, exceto o estímulo a ser estudado que, neste caso, foi a inoculação com *M. javanica*. Portanto, os genes expressos apenas em raízes de soja PI não inoculadas podem estar associados a processos de desenvolvimento normal dessas raízes. Interessantemente, vários transcritos foram encontrados, os quais codificam proteínas que estão envolvidos em resposta de plantas a estresses, incluindo proteína ser/ter kinase, possível inibidor de protease do tipo tripsina Kunitz, inibidor de protease do tipo cisteinase, proteína da família responsiva a etileno e proteína do tipo metalotioneína (Tabela 3). Aparentemente, a presença

desses genes em baixos níveis pode indicar uma eficiente resistência basal ou uma resposta ao ferimento, devido ao crescimento das raízes. Uma vez que esses genes já foram descritos como participantes da cascata de resistência ao ferimento e a insetos, parte da resistência da PI a nematoide também poderia estar associada a esses mecanismos de defesa já previamente elaborados antes da penetração dos mesmos.

TABELA 3 Genes expressos em raízes da linhagem resistente de soja PI 595099 não inoculada com *M. javanica*.

Contig	Nome	Organismo	Código de Acesso	E-value	Número de EST's		Total EST's
					PIN	PII	
Contig7	Hypothetical protein Positives = 66/70 (94%)	<i>Vitis vinifera</i>	emb CAN65763.1	3e-31	4	2	6
Contig12	ADP-ribosylation factor Positives = 181/181 (100%)	<i>Hyacinthus orientalis</i>	<a href="#">gb AAT08648.1 </a>	2e-99	3	1	4
Contig15	Polyprotein Positives = 29/58 (50%)	<i>Potato virus Y</i>	<a href="#">gb ABC70481.1</a>	0.6	3	0	3
Contig22	No hit blast	-	-	-	3	0	3
Contig23	Methionine-R-sulfoxide reductase B1 protein Positives = 130/148 (87%)	<i>Capsicum annuum</i>	<a href="#">gb ABO64854.1 </a>	1e-72	3	0	3
Contig24	Ser/Thr protein kinase Positives = 31/31 (100%).	<i>Lotus japonicus</i>	<a href="#">dbj BAD95894.1 </a>	7e-10	2	1	3
Contig26	Wound-induced basic protein, Positives = 46/47 (97%),	<i>Vitis vinifera</i>	<a href="#">emb CAO15234.1 </a>	5e-17	2	1	3
Contig27	No hit blast	-	-	-	3	0	3
Contig28	Auxin-repressed 12.5 kDa protein, Positives = 52/55 (94%)	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<a href="#">gb AAG33924.1 </a>	1e-23	3	0	3

(...continua...)

TABELA 3, Cont.

Contig29	60S ribosomal protein L27a-2 Positives = 124/134 (92%).	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp Q9LR33.1 R27</a> <a href="#">A2_ARATH</a>	5e-54	3	0	3
Contig30	No hit blast	-	-	-	3	0	3
Contig31	Putative Kunitz trypsin protease inhibitor Positives = 109/109 (100%).	<i>Glycine max</i>	<a href="#">gb ACA23205.1 </a>	2e-59	3	0	3
Contig32	Metallothionein-like protein 1 Positives = 45/57 (78%)	<i>Trifolium repens</i>	<a href="#">sp P43399.1 MT1</a> <a href="#">TRIRP</a>	8e-13	3	0	3
Contig40	Cysteine proteinase inhibitor (Cystatin) Positives = 88/94 (93%),	<i>Vigna unguiculata</i>	<a href="#">sp Q06445.1 CYTI</a> <a href="#">VIGUN</a>	5e-41	2	0	2
Contig45	Grx_I1 - glutaredoxin subgroup III, Positives = 94/170 (55%)	<i>Zea mays</i>	<a href="#">gb ACG27551.1 </a>	2e-27	2	0	2
Contig47	Ethylene-responsive family protein, Positives = 97/121 (80%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_194639.1 </a>	7e-42	2	0	2
Contig49	Histidine-containing phosphotransfer protein 1 Positives = 130/154 (84%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">sp Q9ZNV9.1 AH</a> <a href="#">P1_ARATH</a>	7e-46	2	0	2

(...continua...)

TABELA 2, Cont.

Contig55	Putative mitochondrial ABC transporter ATM1b Positives = 39/79 (49%)	<i>Antonospora locustae</i>	<a href="#">gb AAY27418.1 </a>	5.1	2	0	2
Contig56	Hypothetical protein Positives = 73/77 (94%)	<i>Vitis vinifera</i>	<a href="#">emb CAN70604.1 </a>	5e-32	2	0	2
Contig59	Ribosomal protein L19 Positives = 78/82 (95%)	<i>Hyacinthus orientalis</i>	<a href="#">gb AAT08672.1 </a>	5e-26	2	0	2
Contig67	Small nuclear ribonucleoprotein, putative Positives = 52/53 (98%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">gb AAM63846.1 </a>	1e-22	2	0	2
Contig75	hypothetical protein OsI_20016 Positives = 32/63 (50%)	<i>Oryza sativa</i>	<a href="#">gb EEC79253.1 </a>	9.0	2	0	2
Contig76	Putative lysine decarboxylase, Positives = 31/32 (96%)	<i>Musa balbisiana</i>	<a href="#">dbj BAG70979.1 </a>	5e-08	2	0	2
Contig78	Far-red impaired responsive family protein / FAR1 family protein, Positives = 178/235 (75%)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<a href="#">ref NP_567085.1 </a>	2e-65	2	0	2
<b>24</b>					61	6	67

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem consideravelmente para a elucidação dos mecanismos moleculares de resistência da linhagem de soja PI 595099 ao nematoide *M. javanica*. A estratégia empregada para prospecção de genes em larga escala, mediante esta condição de estresse, revelou um considerável número de genes diferentes encontrados em relação ao número de ESTs sequenciadas. Outro ganho deste trabalho está na observação de que os genes encontrados em raízes não inoculadas são diferentes daqueles encontrados nas raízes inoculadas, revelando as mudanças transcricionais elaboradas em resposta à penetração do nematoide. Tanto em raízes não inoculadas quanto em raízes inoculadas com *M. javanica* foram encontrados muitos genes expressos que codificam proteínas envolvidas em resposta de defesa de plantas a estresses bióticos e abióticos, tendo ficado evidente que as respostas eram diferentes. Portanto, mecanismos de resistência diferentes atuam antes e depois da presença do nematoide. Aparentemente, níveis basais de uma imunidade inata (resistência basal) estão atuando previamente com elementos envolvidos numa resistência a ferimento e insetos, enquanto uma resistência elaborada foi encontrada posteriormente, com a participação de elementos envolvidos no fortalecimento de parede celular, aumento da permeabilidade da membrana celular à água, repressão de auxina e elementos de vias metabólicas secundárias (como a rota dos fenilpropanoides). Este trabalho deve ser continuado com a validação dos dados de expressão gênica pela análise quantitativa de transcritos por PCR em tempo real.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKHALFIOUI, F.; RENARD, M.; FRENO, P.; KEICHINGER, C.; MEYER, Y.; GELHAYE, E. HIRASAWA, M.; KNAFF, D. B.; RITZENTHALER, C.; MONTRICHARD, F. A Novel Type of Thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. **Plant Physiology**, Washington, v. 148, p. 424-435, 2008.

ALKHAROUF, N.; KHAN, R.; MATTHEWS, B. Analysis of expressed sequence tags from roots of resistant soybean infected by the soybean cyst nematode. **Genome**, Ottawa, v. 47, p. 380-388, 2004.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da soja (*GlycIn::e Max L.*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, n. 215, p. 403-410, 1990.

AUDIC, S.; CLAVERIE, J. M. The significance of digital gene expression profiles. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 7, p. 986-995, 1997.

BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TREMBL. **Nucleic Acids Res.** Oxford, v. 25, p. 31-36, 1997.

BALMER, Y.; VENSEL, W. H.; TANAKA, C. K.; HURKMAN, W. J.; ROUHIER, N.; JACQUOT, J-P.; MANIERI, W.; SCHURMANN, P.; DROUX, M.; BUCHANAN, B. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. **The Proceedings National of Academy Science of The United States of America**, Berkely, v. 101, n. 8, p. 2642-2647, 2004.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, 1981. (Resumo).

BRINKLER, M.; VAN-ZYL, L.; LIU, W.; CRAIG, D.; SEDEROFF, R. R.; CLAPHAM, D. H.; VON ARNOULD, S. Microarray Analysis of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*. **Plant Physiology**. Washington, v. 135, p. 1-13, 2004.

CHIANG, H. C.; LO, J. C.; YEH, K. C. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 40, n. 21, p. 6792-6798, 2006.

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, p. 748-753, 2003

CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. The zinc finger of network of plants. **Cellular Molecular Life Science**. Basel, v. 65, p. 1150-1160, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Dados de produção**. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 01 jan. 2009.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue culture**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

CORAM, T. E.; PANG, E. C. Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to *Ascochyta rabiei*. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 647-666, 2006.

CRISTOFANI-YALY, M.; BERGER, I. J.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DORTA, S. DE; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A. A DE; BOSCORIOL-CAMARGO, R. L.; REIS, M. S.; MACHADO, M. A. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV analysis and silico hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 972-979, 2007. Suplement.

DE ALMEIDA-ENGLER, J.; VLEESSCHAUWER, V. de; BURSSSENS, S.; CELENZA-JUNIOR, J. L.; INZÉ, D.; MONTAGU, M. V.; ENGLER, G.; GHEYSEN, G. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. **The Plant Cell**. Rockville, v. 11, n. 5, p.793-808, 1999.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Dados de produção**. Disponível em: <[www.cnpso.embrapa.br](http://www.cnpso.embrapa.br)>. Acesso em: 01 jan. 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Dados de produção**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

FISHER, R.A. **Statistical methods for research workers**. 4.ed. London: Oliver & Boyd, 1932. 307 p.

FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E. C.; NOVELLI, V. M.; SILVA-PINHATI, A. C.; BASÍLIO-PALMIERI, A. C.; TARGON, A. L.; MACHADO, M. A. Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 980-990, 2007. Suplement.

FUJIWARA, S.; TANAKA, N.; KANEDA, T.; TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A.; CHE, F. S. Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flegellin perception in the culture rice cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 17, n. 9, p. 986-998, 2004.

GELHAYE, E.; ROUHIER, N.; NAVROT, N.; JACQUOT, J. P. The plant thioredoxin system. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 62, n. 1, p. 24-35, 2005.

HE, X-J.; UM, R. L.; CAO, W-H.; ZHANG, Z-G.; ZHANG, J-S.; CHEN, S-Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. **The Plant Journal**, v. 44, n. 6, p. 903-916, 2005.

HESLER, L. S.; DASHIELL, K. E.; LUNDGREN, J. G. Characterization of resistance to *Aphis glycIn:es* in soybean accessions. **Euphytica: netherlands journal of plant breeding**, Wageningen, v. 154, p. 91-99, 2007.

HUNTAGURA, P.; MATHESIUS, U.; JONES, M. G. K.; ROLFE, B. G. Auxin accumulation is a trigger for root gall formation caused by rootknot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 26, p. 221-231, 1999.

HWANG, E. W.; KIM, K. A.; PARK, S. C.; JEONG, M. J.; BYUN, M. O.; KWON, H-B. Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. **Journal of Bioscience**, Bangalore, v. 30, p. 101-111, 2005.

INACIO, A. F. **Metalotioneína e metais em geophagus brasiliensi- Acará**. 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública.

JANTASURIYARAT, C.; GOWDA, M.; HALLER, K.; HATFIEL, J.; LU, G.; STAHLBERG, E.; ZHOU, B.; LI, H.; KIM, H.; YU, Y.; DEAN, R. A.; WING, R. A.; SODERLUNG, C.; WANG, G. Large-scale indentification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interactions. *Genome Analysis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 138, p. 105-115, 2005.

KIKUCHI, K.; UEGUCHI-TANAKA, M.; YOSHIBA, K. T.; NAGATO, Y.; MATSUSOKA, M.; HIRANO, H. Y. Molecular analysis of de NAC gene family in rice. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 262, n. 6, p. 1047-1051, 2000.

KIM, S.; AHN, II-P.; LEE, Y-H. Analysis of genes expressed during Rice-*Magnaphorte grisea* Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Saint Paul, v. 14, n. 11, p. 1340-1346, 2001.

KLINK, V. P.; ALKHAROUF, N.; MACDONALD, M.; MATTHEWS, B. Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of Glycine max (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 59, n. 6, p. 965-979, 2005.

KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. The poplar root transcriptome: analysis of 7000 expressed sequence tags. **FEBS Letters**. Amsterdam, n. 542, p. 37-41, 2003.

LOHAR, D. P.; SCHAFF, J. E.; LASKEY, J. G.; KIEBER, J. J.; BILYEU, K. D.; BIRD, M. D. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rizhobial symbioses. **The Plant Jounal: for cell and molecular biology**, Gainesville, v. 38, p. 203-214, 2004.

NEGI, J.; MATSUDA, O.; NAGASAWA, T.; OBA, Y.; TAKAHASHI, H.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; HASHIMOTO, M.; IBA, K. CO2

regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. **Nature**, London, v. 452, n. 7186, p. 483-486, 2008.

NURUZZAMAN, M.; GUPTA, M.; ZHANG, C.; WANG, L.; XIE, W.; XIONG, L. ZHANG, Q.; LIAN, X. Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. **Molecular Genetics Genomics**, Berlin, v. 280, p. 139-151, 2008.

OKUBO-KURIHARA, E.; SANO, T.; HIGATI, T.; KUTSUNA, N.; HASEZAWA, S. Acceleration of vacuolar regeneration and cell growth by overexpression of an aquaporin *NtTIP1*; in tobacco BY-2 cells. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 1, p. 151-160, 2009.

OKUSHIMA, Y.; MITINA, I.; QUACH, H. L.; THEOLOGIS, A. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (*ARF2*): a pleiotropic developmental regulator. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Gainesville, v. 43, n. 1, p. 29-46, 2005.

PAPPAS, G. R.; MIRANDA, R. P.; MARTINS, N. F.; FOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. C. SisGen; A CORBA Based Data Management Program for DNA sequencing projects. **Lecture Notes in Computer Science**, Berlin, v. 5109, p. 116-123, 2008.

PAZ-ARES, J.; GHOSAL, D.; WIENAND, U.; PETERSON, P. A.; SAEDLER, H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. **EMBO Journal: European Molecular Biology Organization**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 3553-3558, 1987.

PROITE, K. **Buscas de genes envolvidos na resistencia de amendoim silvestre ao nematóide das galhas (*Meloidogyne arenaria*)**. 2007. 213 p. Tese (Doutorado)-Universidade de Brasília, Brasília.

REDDY, A. S. N.; POOVAIAH, B. W. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin regulated gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, p. 127-136, 1990.

RIVAS, S.; ROUGON-CARDOSO, A.; SMOKER, M.; SCHAUSER, L.; YOSHIOKA, H.; JONES, J. D. G. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. **EMBO Journal:**

**European Molecular Biology Organization**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 2156-65, 2004.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A. World perspective on Nematology- the Role of society. **Journal of Nematology**, College Park, v. 18, n. 4, p. 596-596, 1986.

SHIMIZU, M.; SUZUKI, K.; MIYAZAWA, Y. Differential accumulation of the mRNA of the auxin-repressed gene CsGRP1 and the auxin induced peg formation during gravimorphogenesis of cumcuber seedlings. **Planta**. Berlin, v. 225, p. 13-22, 2006.

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

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLLETA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; CARLOS, E. F.; LOCALI-FABRIS, E. C.; AMARAL, A. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; SILVA-PINHATI, A. C. O.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; BERGER, I. J.; RODRIGUES, C. M.; REIS, M. S.; MACHADO, M. A. Analysis of expressed sequences tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 957-964, 2007. Supplement.

STEINER, C.; BAUER, J.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Two novel genes are differentially expressed durin early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. **Biochemistry and Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 625, p. 123-133, 2003.

STEKEL, D. J.; GIT, Y.; FALCIANI, F. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, p. 2055-2061, 2000.

TAKATSUJI, H. Zinc-finger transcription factors in plants. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 54, n. 6, p. 582-96, 1998.

TATUSOV, R. L.; FEDEROVA, N. D.; JACKSON, J. D.; JACOBS, A. R.; KIRYUTIN, B.; KOONIN, E. V.; KRYLOV, D. M.; MAZUMDER, R.;

MEKHEDOV, S. L.; NIKOLSKYA, A. N.; RAO, B. S.; SMIRNOV, S.; SVERDLOV, A. V.; VASUDEVAN, S.; WOLFI, Y. I., YIN, J. J.; NATALE, D. A. The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 41, p. 1471-2105, 2003.

WONG, H. L. SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, T.; UMEMURA, K.; SHIMAMOTO, K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in Rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, p. 1447-156, 2004.

YORINORI, J. T. Riscos de surgimento de novas doenças na cultura da soja. In: CONGRESSO DE TECNOLOGIA E COMPETITIVIDADE DA SOJA NO MERCADO GLOBAL, 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Fundação MT, 2000. p.165-169.

ZEBA, N.; ISBAT, M.; JUNG-KNOWN, N.; LEE M. O.; KIM, S. R.; HONG, C. B. Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annum* enhances growth os transgenic tobacco. **Planta**, Berlin, Disponível em: <DOI 10.1007/s00425-008-0884-0>. Acesso em: 10 nov. 2008.

ZHAO, Q.; LEUNG, S.; CORBETT, A.; MEIER, I. Identificaton and characteization of of the arabidopsis orthologs of nuclear transport factor 2, the nuclear import factor of Ran1. **Plant Physiology**, Washington, v. 140, p. 869–878, 2006.

ZHONG, R.; DEMURA, T.; YE, Z-H. SND1, A NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3158-3170, 2006.

## CONCLUSÕES FINAIS

As alterações histopatológicas caracterizam a resistência pós-infeccional da linhagem PI 595099 ao ataque de *M. javanica*.

Aspectos moleculares atuam na mudança da expressão de genes que conferem resistência da linhagem PI 595099 a *M. javanica*.

Genes expressos em raízes de soja PI não inoculadas revelam níveis de resistência basal.

Genes expressos em raízes de soja PI inoculadas revelam respostas relacionadas à sua resistência a nematoides do gênero *Meloidogyne*.

## PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, novos clones já foram sequenciados e serão adicionados às bibliotecas de PI 595099. Isto possibilitará informações mais seguras quanto aos dados de subtração *in silico*. A validação dos genes candidatos encontrados neste trabalho pode ser feita por meio da técnica de PCR, em tempo real. A construção das duas bibliotecas de cDNA da cultivar suscetível BRSMG 250 Nobreza, sob as mesmas condições, inoculada e não inoculada com *M. javanica*, encontra-se em andamento e as informações obtidas dessa interação compatível aumentará os conhecimentos sobre os mecanismos que envolvem a interação soja-*M. javanica*. Além disso, análises histopatológicas adicionais mostrando a formação de células gigantes, ensaios com exsudatos radiculares desses genótipos e, ainda, análises envolvendo proteômica e metabolômica serão de grande relevância para este estudo.