

GILZA BARCELOS DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *BZIP105* E *ARP* (*AUXIN REPRESSED PROTEIN*) DE SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S729c
2018 Souza, Gilza Barcelos, 1990-
Caracterização funcional dos genes *BZIP105* e *ARP* (*auxin repressed protein*) de soja : . / Gilza Barcelos Souza. - Viçosa, MG, 2018.

xiv, 103 : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 77-95.

1. Fitopatógenos. 2. Resistência a doença. 3. Fator de transcrição.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Doutorado em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 583.74

GILZA BARCELOS DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES *BZIP105* E *ARP* (*AUXIN REPPRESSED PROTEIN*) DE SOJA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2018.

Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Sergio Herminio Brommonschenkel

Tais Cristina Bastos Soares

Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes
(Coorientadora)

Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

A minha família

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por me dar esperança.

À Universidade Federal de Viçosa e EMBRAPA SOJA pela infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida;

A CAPES, FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro aos projetos.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto, pela excelente orientação, pela paciência sempre, pela confiança no meu trabalho, pelas oportunidades oferecidas durante minha pós-graduação, pelas ajudas valiosas durante a realização dos experimentos;

Ao coorientador Murilo Siqueria Alves, por inúmeras ajudas nos protocolos, por ser sempre presente mesmo distante.

A minha co-orientadora Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães pela oportunidade e ensinamentos.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, principalmente pela ajuda na parte de bioinformática, e por toda disponibilidade em ajudar sempre;

Ao professor Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa pela ajuda nos sequenciamentos e experimentos com nematóides.

A kênia e Michelle pela enorme contribuição nos experimentos de silenciamento gênico.

A Amanda e Patrícia por contribuições em diversos experimentos. Por toda boa vontade em me ajudar sempre que eu precisei. Obrigada meninas por poder contar com vocês em tantos momentos.

Ao meu querido amigo Eduardo Monteiro obrigada pela amizade e carinho sempre.

Aos meus pais e irmãos e, em especial a minha irmã Selma e ao meu irmão Sergio que sempre acreditaram e apostaram em meus sonhos, sem eles essa caminhada não seria possível;

Aos meus amigos Mônica, Aninha, Carlos, Lucas, Angélica por estarem presentes na minha vida, apoiando, nos momentos mais imprescindíveis.

Aos amigos do LBM pela agradável convivência e ótimo ambiente de trabalho que tive durante o tempo que trabalhei com vocês, além das ajudas valiosas nos experimentos. Não teria aprendido nada se não fosse por vocês!

Aos colegas dos Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EMBRAPA SOJA.

Ao Guilherme, funcionário do DFP, por me ajudar no cultivo das plantas de soja na casa de vegetação e ao professor Murilo Zerbini por ceder espaço para o cultivo das plantas.

A todos que de alguma forma contribuíram para meu engrandecimento profissional e pessoal.

A todos que eu não possa não ter citado, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Vias moleculares de defesa vegetal.....	3
2.2. Via de sinalização de auxina em resposta a estresse biótico	4
2.3. Os fatores de transcrição bZIPs responsivos a estresse biótico.....	6
2.4. Família gênica <i>DRM1/ARP</i>	9
2.4.1. <i>DRM1/ARP</i> e estresse biótico.....	12
3. OBJETIVO GERAL.....	14
3.1. Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Clonagem dos genes <i>GmARP15g</i> e <i>GmbZIP105</i> em vetores de expressão	15
4.2. Superexpressão de do fator de transcrição <i>GmbZIP105</i> em protoplastos de soja	16
4.2.1 Obtenção e transformação de protoplastos de soja.....	16
4.2.2 Extração, quantificação e qualidade do RNA	16
4.2.3 Tratamento com DNase I, síntese de cDNA e análises de qRT-PCR	17
4.2.4 Construção e quantificação das bibliotecas	20
4.2.5 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA.....	20
4.2.6 Análises de qualidade do conjunto de dados do sequenciamento	21
4.2.7 Montagem dos transcritos por referência	21
4.2.8 Validação dos genes relacionados com a fotossíntese identificados na triagem alvo específicos do fator de transcrição <i>GmbZIP105</i>	22
4.3 Duplo híbrido em leveduras.....	22
4.3.1 Clonagem dos genes <i>GmARP15g</i> e <i>GmbZIP105</i> em vetores de expressão	22
4.3.2 Transformação de leveduras com BD- <i>GmbZIP105</i> e AD- <i>GmARP15g</i> e avaliação da atividade do gene repórter <i>HIS3</i>	23
4.3.3 Triagem para identificação de parceiros de interação com a proteína <i>GmARP15g</i>	23

4.4	Análise <i>in-silico</i> e perfil de expressão dos genes <i>DRM1/ARP</i> em soja.....	24
4.4.1	Identificação dos genes <i>DRM1/ARP</i> em quatro espécies de leguminosas	24
4.4.2	Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	25
4.4.3	Desenho de oligonucleotídeos dos grupos específicos de <i>DRM1/ARP</i> em soja.....	25
4.4.4	Análise do perfil de expressão dos grupos da família <i>DRM1/ARP</i> em diferentes tecidos de soja e em resposta a hormônios	28
4.4.5	Análise do perfil de expressão dos grupos da família <i>DRM1/ARP</i> em raízes de soja suscetível inoculadas com nematóide <i>M. javanica</i>	28
4.4.6	Análise do perfil de expressão dos grupos da família <i>DRM1/ARP</i> em plantas de soja suscetíveis infectadas com <i>P. pachyrhizi</i>	29
4.4.7	Análises do perfil de expressão de genes relacionados auxina em plantas de soja infectadas com fungo <i>P. pachyrhizi</i>	29
4.4.8	Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR e análises estatísticas.	29
4.5	Silenciamento dos genes <i>GmbZIP105</i> e <i>GmARP15g</i>	30
4.5.1	Construção de plasmídeo de VIGS	30
4.5.2	Produção de inóculo viral	31
4.5.3	Experimento VIGS	31
4.5.4	Avaliação fenotípica	32
4.5.5	Extração de RNA	33
4.5.6	Confirmação do silenciamento gênico por ensaios de qRT-PCR.....	33
4.6	Técnicas de Biologia Molecular	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Triagem para obtenção de genes alvos do fator de transcrição <i>GmbZIP105</i>	37
5.1.1	Validação da superexpressão do gene <i>GmbZIP105</i> em protoplastos de soja por qRT-PCR.....	37
5.1.2	O fator de transcrição <i>GmbZIP105</i> regula a expressão de genes relacionados com a fotossíntese.....	37
5.2	<i>GmARP15g</i> codificada pelo gene <i>Glyma.15G076500</i> , que interage com o fator de transcrição <i>GmbZIP105</i> , é membro de uma família de proteínas com domínio <i>dormancy/auxin associated protein</i>	43
5.3	Análise <i>in-silico</i> e perfil de expressão dos genes <i>DRM1/ARP</i> em soja.....	47
5.3.1	Identificação e nomenclatura da família gênica <i>DRM/ARP</i> em quatro leguminosas.....	47
5.3.2	Análise pelo método de <i>K-means</i> e análise filogenéticas dos membros da família <i>DRM1/ARP</i>	52

5.3.3	Análises de expressão dos grupos da família DRM/ARP em tecidos soja.....	54
5.3.4	Análises de expressão dos grupos da família DRM1/ARP de soja em resposta ao tratamento com os hormônios IAA e MeJA	56
5.3.5	Análises de expressão dos grupos da família DRM1/ARP em resposta a infecção por <i>M.javanica</i>	58
5.3.6	Análises de expressão dos grupos da família DRM1/ARP e genes relacionados com auxinas em resposta a infecção por <i>P. pachyrhizi</i>	59
5.4	Identificação de parceiros de interação da proteína GmARP15g	61
5.5	Silenciamento dos genes <i>GmbZIP105</i> e <i>GmARP15g</i> em soja	64
5.5.1	Silenciamento do gene <i>GmbZIP105</i> induz a expressão do gene <i>GmPRI</i>	64
5.5.2	Silenciamento do gene <i>GmARP15g</i> resulta em maior suscetibilidade à infecção com <i>P. pachyrhizi</i>	68
5.6	Perfil de expressão do gene <i>GmbZIP105</i> em resposta à auxina.....	71
5.7	Relação funcional entre as proteínas <i>GmbZIP105</i> e <i>GmARP15g</i>	72
6	CONCLUSÃO	73
7	REFERÊNCIAS	77
8.	MATERIAL SUPLEMENTAR	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores de transcrição bZIPs que são responsivos à infecção por patógenos e / ou hormônios, e os processos fisiológicos envolvidos

Tabela 2: Proteínas da família DRM1/ARPs e os possíveis processos fisiológicos envolvidos.

Tabela 3: Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* em vetores de expressão.

Tabela 4: Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR.

Tabela 5: Oligonucleotídeos para avaliar o perfil de expressão dos grupos da família DRM/ARP em soja por meio de qRT-PCR.

Tabela 6: Oligonucleotídeos específicos para clonagem parcial dos genes *GmbZIP105* e *GmARP* no vetor pBPMV-1033 e para a confirmação do VIGS por qRT-PCR.

Tabela 7: Genes selecionados para validação da triagem dos alvos do fator de transcrição *GmbZIP105* por qRT-pCR

Tabela 8: Genes down-regulados no transcriptoma de protoplastos superexpressando *GmbZIP105*.

Tabela 9: Genes up-regulados no transcriptoma de protoplastos superexpressando *GmbZIP105*.

Tabela 10: Lista de genes DRM1/ARP em leguminosas, *A. thaliana* e *B.rapa*.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Via de sinalização mediada por pelo hormônio auxina.

Figura 2: Validação da superexpressão de *GmbZIP105* (OE-*GmbZIP105*) em protoplastos de soja.

Figura 3: *GmbZIP105* interage com *GmARP15g* no sistema de duplo híbrido de leveduras.

Figura 4: Análise de agrupamentos das proteínas DRM1/ARP.

Figura 5: Árvores filogenéticas das proteínas DRM1/ARP de 4 leguminosas, *A.thaliana* e *B.rapa* de cada grupo.

Figura 6: Perfil de expressão dos membros dos grupos 1, 2 e 3 de DRM1/ARP em diferentes tecidos (folha, caule, raiz e semente) do cultivar CD206 de soja.

Figura 7: Perfil de expressão do *GmAUX/IAA* (A) e dos membros dos grupos 1 (B), 2 (C) e 3 (D) da família DRM1/ARP no cultivar CD 206 em resposta ao tratamento com 100µM de IAA.

Figura 8: Perfil de expressão do gene *GmVSP2* (A) e dos membros dos grupos 1 (B), 2(C) e 3(D) da família DRM1/ARP no cultivar CD 206 em resposta ao tratamento com 100µM de MeJA.

Figura 9: Perfil de expressão dos membros dos grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) de DRM1ARP no genótipo suscetível durante a infecção por *M.javanica*.

Figura 10: Perfil de expressão dos membros dos grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) da família DRM1/ARP no genótipo suscetível (EMBRAPA48) durante a infecção por *P. pachyrhizi*.

Figura 11: Perfil de expressão dos *GmTIR1* (A), *GmARF* (B), *GmASB1* (C), *GmExpA* (D) e *GmAUX/IAA*(E) no genótipo suscetível (EMBRAPA48) durante a infecção por *P. pachyrhizi*.

Figura 12: Identificação de parceiros que interagem com a proteína de *GmARP15g* no sistema de duplo híbrido de leveduras.

Figura 13: Plantas de soja cultivar Williams 82 silenciadas para o gene *GmbZIP105*.

Figura 14: Perfil de expressão dos genes *GmbZIP105* (A), *GmPR1* (B), *GmPR2*(C) e *GmTGA2*(D) em genótipos Williams 82 infectados por *P. pachyrhizi*.

Figura 15: Plantas de soja cultivar Williams 82 silenciadas para o gene *GmARP15g*.

Figura 16: Perfil de expressão dos genes *GmARP15g* (A), *GmPR1*(B) no genótipo Williams 82 infectado por *P. pachyrhizi*

Figura 17: Perfil de expressão do gene *GmbZIP105* no cultivar CD 206 em resposta ao tratamento com 100µM de IAA.

Figura 18: Modelo hipotético envolvendo de interações entre as proteínas GmARP15g, GmPsbs e GmbZIP105 em plantas suscetíveis não infectadas e infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*.

Figura 19: Modelo hipotético envolvendo de interações entre as proteínas GmARP15g, GmPsbs e GmbZIP105 em plantas suscetíveis VIGS-*GmbZIP105* e infectadas e com o fungo *P. pachyrhizi*.

Figura 20: Modelo hipotético envolvendo de interações entre as proteínas GmARP15g, GmPsbs e GmbZIP105 em plantas suscetíveis VIGS-*GmARP15g* e infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3AT - *3-aminotriazole*

ABA - *Ácido abscísico*

AD - *Activation domain*

AP2/EREBP - *Apetala2/Ethylene-Responsive Element Binding Factors*

ARF - *Auxin responsive factors*

AS - *Ácido salicílico*

ASBI - *Anthranilate Synthase Beta Subunit*

AUX/IAA - *Auxin/indole-acetic acid-inducible*

AuxREs - *Auxin responsive elements*

BD- *Binding domain*

BLASTP- *Basic Local Alignment Search Tool Protein*

Bzip - *Basic leucine zipper containing domain proteins*

CDS - *Sequência codificante*

CHS15 - *Chalcona sintase 15*

CMV - *Cucumber mosaic virus*

Ct - *Threshold cycle*

CYP79B2, CYP79B3 - *Cytochrome P450, family 79, subfamily b, polypeptide 2 / 3*

DEPC - *Diethyl pyrocarbonate*

DRM1/ARP - *Dormancy-associated gene-1/- auxin-repressed protein*

ERF - *Ethylene response factor*

ET - *Etileno*

ETI - *Effector-triggered immunity*

EXPA - *Expansina A*

EXPB - *Expansina B*

FAS - *Ferrugem asiática da soja*

Fgl2 - *Flagelina*

FPKM - *Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*

G/HBF1 - *G-box/H-box binding factor 1*

GH3 - *Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase*

GmARP15g - *Auxin-repressed protein (Glyma.15G076500)*

H₂O₂ - *Peróxido de hidrogênio*

His - *Histidina*

HLSV - *Hibiscus latent Singapore virus*
HR - *Hypersensitive response*
IAA - *Indole 3-acetic acid*
JÁ - *Jasmonic acid*
Leu - *Leucina*
LSD1 - *Lesions Simulating Disease resistance*
MeJA - *Metil Jasmonato*
MS - *Murashige e Skoog*
MYB - *myeloblastosis related proteins*
MYC - *Myelocytomatosis related proteins*
NPR1 - *Non-Expresser Of Pathogen-Related 1*
NtARPI/GERI1 - *Auxin-repressed protein/growth enhancement and resistance impairment 1*
PAMPS - *Pathogen-associated molecular patterns*
PEG - *Polietilenoglicol*
PMMV - *Pepper mild mottle virus*
PRR - *Pattern recognition receptors*
PSII - *Photosystem II*
PTI - *Pattern-triggered immunity.*
RNAseq - *RNA Sequencing*
SAURs - *Small auxin-up RNAs*
SD - *Synthetic dropout*
SMV - *Soybean Mosaic Virus*
ssDNA - *DNA fita simples de esperma de salmão*
TIR1 - *Transport inhibitor response 1*
TMV - *Tobacco mosaic virus*
Trp - *Triptofano*
VIGS - *Virus-induced gene silencing*

RESUMO

SOUZA, Gilza Barcelos de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Caracterização funcional dos genes *BZIP105* e *ARP* (*auxin repressed protein*) de soja.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Murilo Siqueira Alves e Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes.

Em resposta a infecções por patógenos, as plantas modulam vias de sinalização mediada por hormônios, tais como SA, MeJA e auxina. Essas vias podem resultar em alteração da expressão gênica, processo importante para a mitigação dos efeitos da infecção. Essa reprogramação transcricional é regulada através de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição da família gênica *bZIPs* são reguladores importantes em plantas e alguns de seus membros estão envolvidos em respostas de defesa contra patógenos. Neste estudo, descreveu-se a caracterização funcional do fator de transcrição GmbZIP105 e da proteína GmARP15g em resposta a infecção pelo fungo causador da ferrugem asiática da soja. Além disso, potenciais grupos da família *DRM1/ARP* foram identificados por meio de metodologias de agrupamento *in silico* de sequências. Os perfis de expressão de genes presente nestes grupos foram avaliados em resposta ao tratamento com os hormônios auxina e MeJA e à infecção por patógenos em plantas de soja. As proteínas GmbZIP105 e GmARP15g interagem em ensaios de duplo híbrido de leveduras. Além disso, apresentam o mesmo perfil transcricional em resposta ao tratamento com os hormônios MeJA e auxina. GmbZIP105 induz a expressão de genes relacionados a fotossíntese, enquanto GmARP15g interage com PSBS, uma proteína que compõe o PSII. Esses resultados sugerem uma relação funcional entre estas proteínas e que, provavelmente, GmARP15g modula a localização ou a atividade do fator de transcrição GmbZIP105.

ABSTRACT

SOUZA, Gilza Barcelos de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. ***BZIP105* and *ARP* (auxin repressed protein) gene functional characterization in soybean.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Murilo Siqueira Alves and Francismar Corrêa Marcelino-Guimaraes.

In response to pathogen infections, plants modulate a series of signaling pathways that are mediated by hormones, such as SA, MeJA and auxin. These pathways may result in gene expression alteration that is important for mitigating the effects of infection. This transcriptional reprogramming is regulated by transcription factors. bZIP's transcriptional factors are important regulators in plants. Some of their members are involved in defense responses against pathogens. This study describes the functional characterization for GmbZIP105 transcriptional factor and GmARP15g protein during response against fungal infection. For that, it was used the fungus that causes ASR – Asian soybean rust. In addition, in silico analysis using clustering methodologies were applied to identify potential DRM1 / ARP family groups. The expression profiles of these groups were evaluated in response to treatment with hormones auxin and MeJA and during pathogen infection in soybean. The proteins GmbZIP105 and GmARP15g interact in two-hybrid yeast assays; in addition, they present the same transcriptional profile in response to treatment with hormones MeJA and auxin and are responsive to pathogen. GmbZIP105 induces the expression of genes related to photosynthesis, while GmARP15g interacts with one of the PSII proteins. These results suggest a functional relationship between both proteins in which GmARP15g probably modulates the localization or activity of the transcription factor GmbZIP105.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram complexos mecanismos de percepção e defesa contra patógenos. Dentre os principais mecanismos de reconhecimento e defesa utilizados por plantas encontra-se PTI e ETI. Resumidamente, as plantas reconhecem os PAMPs por meio de PRR, resultando em uma resposta denominada PTI. Geralmente, este sistema imune é muito eficiente contra organismos não patogênicos ou que não são patogênicos a determinadas espécies. Entretanto, os patógenos secretam efetores capazes de interferir ou suprimir as respostas de PTI, resultando na susceptibilidade da planta. Em contrapartida, algumas plantas possuem proteínas R que reconhecem estes efetores, resultando em ETI. Por fim, alguns patógenos secretam efetores que podem interferir na ETI, resultando em susceptibilidade (Jones e Dangl, 2006).

Além dos mecanismos basais, cascatas de sinalização hormonal são ativadas ou reprimidas em resposta ao estresse biótico. As vias mais bem descritas são: SA que é ativada em resposta a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, a via ácido jasmônico e etileno que é desencadeada em resposta contra herbívoros e patógenos necrotróficos, e auxinas em resposta a patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Essas vias modulam a transcrição gênica, via fatores de transcrição. Dentre as principais famílias de fatores de transcrição presentes em plantas, estão os bZIPs, proteínas que contém uma ou duas regiões com a sequência WRKYGQK (WRKY), MYC, MYB, AP2/EREBP e os fatores da família NAC (Alves *et al.*, 2014).

A família de fatores de transcrição bZIPs é uma das maiores em eucariotos, e em plantas regulam genes envolvidos na maturação de sementes, desenvolvimento da flor, e resposta a estresse abiótico e biótico (Jakoby *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2013). Alguns genes *bZIPs* são responsivos a patógenos: *PPI1*, *CabZIP1*, *CabZIP2*, *TabZIP1* e *GmbZIP105* (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2015).

O gene *GmbZIP105* é induzido em resposta ao tratamento com SA e MeJA, e durante as interações compatíveis e incompatíveis com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja (Alves *et al.*, 2015). A proteína *GmbZIP105* possui estrutura primária similar aos fatores de transcrição G/HBF1, SBZ1 e BZI1 descritos na literatura como responsivos a estresse biótico (Droge-laser *et al.*, 1997; Heinekamp *et al.*,

2004; Yoshida *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015). Estudos recentes de interação-proteína, utilizando ensaios de duplo híbrido em leveduras mostraram que a proteína GmbZIP105 interage com a proteína ARP (GmARP15g) (Souza, 2014).

Os genes *ARPs* e os *DRM1s* codificam proteínas que formam a família DRM1/ARP (Rae *et al.*, 2013), que estão envolvidas com a manutenção de dormência em gemas axilares, desenvolvimento de frutos, repressão do crescimento, e resposta a estresse abióticos e bióticos (Wood *et al.*, 2013; Rae *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014). Em *Nicotiana tabacum*, o silenciamento do gene *NtARP1/GER11* resultou em aumento da suscetibilidade a fungo, bactéria e vírus (Zhao *et al.*, 2014).

Considerando a importância da modulação dos fatores de transcrição por meio de proteínas reguladoras um dos objetivos desse trabalho é confirmar a interação do fator de transcrição GmbZIP105 com a proteína GmARP15g (Souza, 2014). Bem como efetuar a caracterização funcional dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* e seus possíveis papéis nas vias de sinalização mediadas por hormônios em resposta a patógenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vias moleculares de defesa vegetal

As plantas são constantemente desafiadas por patógenos, tais como fungos, vírus, bactérias, nematóides e oomicetos. Esses patógenos causam grandes perdas da produtividade de diversas culturas de interesse agrônomo (Bigeard *et al.*, 2015). Para mitigar seus efeitos é preciso entender profundamente como ocorre a interação planta-patógeno. Para promover uma infecção bem sucedida os organismos invasores precisam superar as barreiras pré-formadas, como camadas de cera e parede celular rígida, e enfrentar o sistema imune vegetal composto de mecanismos de reconhecimento e defesa presente em cada célula da planta (Bigeard *et al.*, 2015). Esse sistema imune é composto pela PTI e ETI, sendo que ambas convergem para diferentes cascatas de sinalização que contribuem para resistência ou tolerância às condições adversas (Mahajan e Tuteja, 2005; Jones e Dangl, 2006).

A PTI é ativada quando as plantas detectam os micro-organismos por meio do reconhecimento de PAMPs pelos PRR, localizados na superfície celular. Os PAMPs são moléculas conservadas dentro de uma classe de organismos com função essencial para sua sobrevivência, por exemplo, flagelina bacteriana e quitina (Jones e Dangl, 2006; Zipfel, 2008; Boller e He, 2010). A ativação da PTI pode resultar em aumento no fluxo de íons, reforço na parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio e alteração na expressão gênica (Zipfel, 2008).

Entretanto, muitos patógenos são capazes de secretar efetores que interferem ou suprimem a sinalização de PTI. Por outro lado, as plantas possuem uma segunda linha de defesa a ETI, sendo capaz de reconhecer esses efetores por meio das proteínas R específicas para cada efector. A ETI muitas vezes culmina na resposta de hipersensibilidade, um tipo de morte celular programada das células no sítio de infecção (Jones e Dangl, 2006; Zipfel, 2008).

A jusante das camadas de defesa basais, existem as principais vias de sinalização mediadas pelos hormônios ABA, SA, JA, etileno e auxina. Os hormônios JA e etileno são descritos por atuarem em vias de defesa em respostas a insetos herbívoros e patógenos necrotróficos, parasitas que derivam seus nutrientes de células mortas ou prestes a morrer. Enquanto, o SA atua na defesa contra hemibiotróficos e biotróficos. Os patógenos biotróficos requerem células vivas para sobreviver, enquanto os hemibiotróficos no início da infecção exibem características de organismos biotróficos, e a medida que a infecção

progride assemelham-se a necrotróficos (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2012; Xin e He, 2013). O papel das auxinas depende diretamente do patógeno envolvido na interação. Por exemplo, níveis elevados de auxinas parecem atuar promovendo a suscetibilidade do hospedeiro, quando infectado com patógenos biotróficos e hemibiotrófico (Kidd *et al.*, 2011; Mutka *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Por outro lado, o acúmulo de auxinas pode promover a resistência contra necrotróficos (Llorente *et al.*, 2008; Mah *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2012).

Essas diferentes vias de sinalização podem agir de forma antagônica ou sinérgica, proporcionando assim, uma flexibilidade de resposta adaptativa contra vários tipos organismos invasores (Verhage *et al.*, 2010). Um interessante exemplo de antagonismos entre vias, ocorre em resposta a patógenos biotróficos, onde a via de sinalização de SA bloqueia as vias sinalização mediada por auxinas (Wang *et al.*, 2007).

2.2. Via de sinalização de auxina em resposta a estresse biótico

As auxinas compreendem um grupo de moléculas, sendo que IAA é a auxina mais abundante em plantas (Sauer *et al.*, 2013). Essa molécula está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo manutenção de dominância apical, tropismo, formação de raiz lateral, diferenciação vascular, alongamento de brotos e resposta a estresse biótico (Verhage *et al.*, 2010; Mutka *et al.*, 2013).

A percepção da auxina pelas células ocorre por meio do reconhecimento do hormônio pelo TIR1. As auxinas atuam como uma cola molecular, promovendo a interação entre o receptor TIR1 e a proteína repressora AUX/IAA da via de sinalização. Após a interação, a porção F-box do receptor TIR1 promove a adição de uma cadeia de poliubiquitina na proteína AUX/IAA, destinando-a para degradação no proteassoma 26S (Dharmasiri *et al.*, 2005; Maraschin *et al.*, 2009). Na ausência de auxina, AUX/IAA mantém-se ligado ao fator de transcrição ARF. Quando a auxina está presente o fator de transcrição ARF é liberado promovendo a ativação ou a repressão de genes responsivos a auxina (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011) (Figura 1).

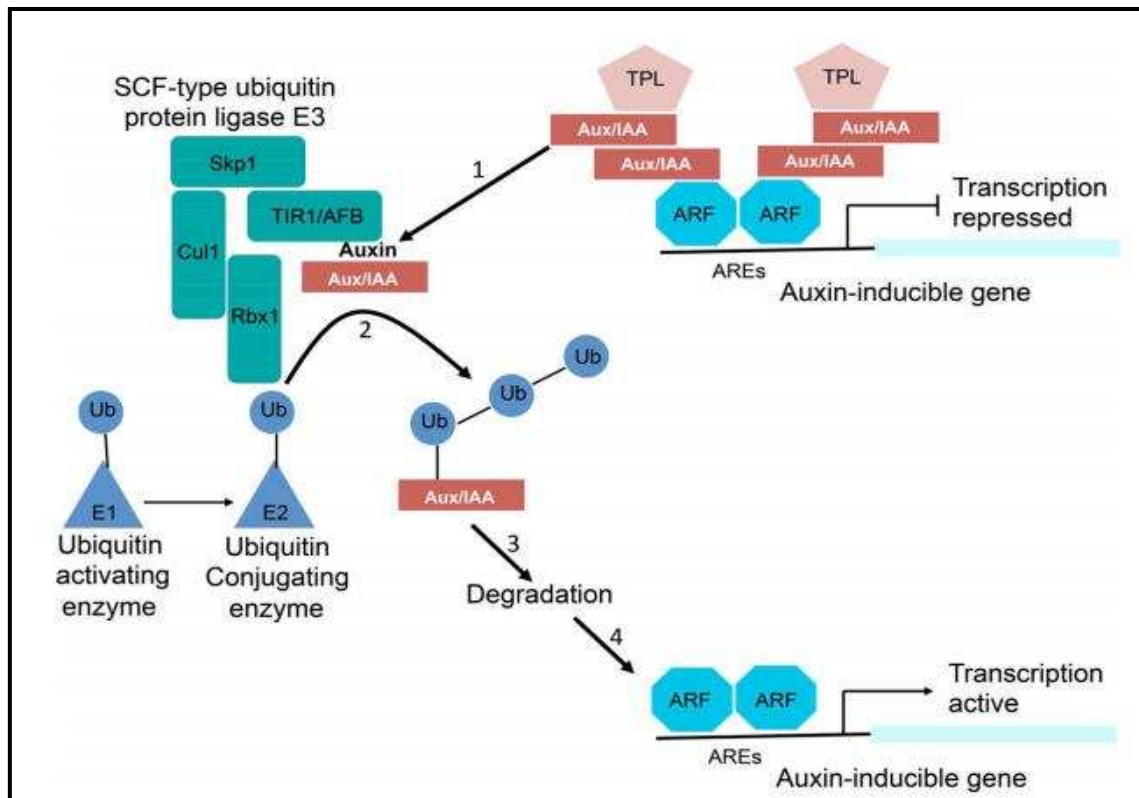


Figura 1: Via de sinalização mediada por pelo hormônio auxina. 1- A auxina atua como uma cola molecular e possibilita a interação entre TIR1 e AUXIAA. A porção F-box da proteína TIR1 adiciona uma cadeia de ubiquitina na proteína AUX/IAA (2), marcando-a para a degradação no proteossoma. (3). Após a degradação de AUX/IAA, o fator de transcrição fica livre e pode regular a expressão de genes responsivos a auxina (4) (Leyser, 2018).

Além das plantas, muitos patógenos são capazes de produzir auxinas. A bactéria *Xanthomonas oryzae* e o fungo hemibiotrófico *Magnaporthe oryzae* secretam IAA no local da infecção. IAA pode atuar como fator de virulência para infecção em arroz pois quando plantas de arroz pré- tratadas com IAA, são mais suscetíveis a infecção com *X. oryzae* e *M. grisea* (Ding *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2011).

Em resposta a infecção por patógenos biotróficos, as plantas ativam as vias de sinalização mediadas por SA, este por sua vez, reprime a transcrição do gene *TIR1*, o que resulta no bloqueio da sinalização mediada por auxinas (Wang *et al.*, 2007). Por outro lado, a expressão de genes da família *GH3* contribuem para redução do *pool* de auxinas livre na célula, forma ativa desse hormônio. Neste contexto de defesa, a superexpressão de *GH3-8* em arroz, resulta em redução no conteúdo de auxinas, e consequentemente

reprime a expressão dos genes responsivos a auxina: *ARF1*, *ARF8*, *EXPA1*, *EXPA5*, *EXPA10*, e *EXPB7* (Ding *et al.*, 2008). A homeostase de auxina também é modulada em arábidoopsis pelo patógeno biotrófico *Plasmodiophora brassicae*, onde ocorre o aumento da expressão dos genes *GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.4*, *GH3.5*, *GH3.14*, e *GH3.1*, que codificam enzimas de conjugação de auxina, e dos genes *TIR1*, *ARF8* e *IAA7*, relacionados a via de sinalização de auxinas (Jahn *et al.*, 2013).

A sinalização de auxina parece promover resistência contra patógenos necrotróficos. Plantas de *Medicago truncatula* tratadas com IAA exógeno são mais tolerantes a infecção por *Macrophomina phaseolina* (Mah *et al.*, 2012). O conteúdo de IAA endógeno é aumentado em plantas de arábidoopsis infectadas com *Alternaria brassicicola*, provavelmente devido a indução da expressão dos genes *ASA1*, *ASB1*, *CYP79B2* e *CYP79B3*, envolvidos na de biossíntese de IAA (Qi *et al.*, 2012).

Algumas bactérias são reconhecidas no início da infecção pela planta como um patógeno necrotrófico, e assim desencadeia a resposta de defesa para esse tipo de patógeno. Neste cenário, plantas resistentes de Ponkan mandarin (*Citrus reticulata Blanco*) infectadas com *Xylella fastidiosa* apresentam aumento de expressão de genes relacionados a auxina (*IAA9*, *ARF19* e *ARF8*) (Rodrigues *et al.*, 2013).

Alguns fungos são capazes de interferir na via de defesa mediada por IAA, como é o caso do fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* que induz a expressão do gene *GH 3.2*, que codifica a enzima IAA amido sintetase, catalisadora da conjugação de IAA com aspartato, resultando na forma inativa do hormônio IAA-asp (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2012). Neste contexto, as plantas de arábidoopsis apresenta maior suscetibilidade a esse patógeno necrotrófico, indicando um potencial papel desse hormônio nas respostas de defesa contra patógenos necrotróficos (Llorente *et al.*, 2008; González-Lamothe *et al.*, 2012).

2.3. Os fatores de transcrição bZIPs responsivos a estresse biótico

Um componente importante da defesa vegetal são os fatores de transcrição. Essas proteínas modulam a expressão gênica que é importante para a mitigação dos efeitos da infecção. Algumas famílias de fatores de transcrição bZIP, ERF, MYB, MYC, NAC e WRKY, possuem papel fundamental nas vias de defesa vegetal (Eulgem, 2005; Alves *et al* 2014; Seo e Choi, 2015). Particularmente, as proteínas bZIPs são reguladores importantes, e alguns de seus membros estão envolvidos em respostas de defesa contra

patógenos (Alves *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2014).

Os membros dessa família possuem um motivo bZIP, caracterizado por um domínio de ligação ao DNA constituído por duas alfa-hélices. A primeira é composta por uma região básica que contém uma sequência de localização nuclear, e a outra região é rica em resíduos de leucina espaçados por seis aminoácidos, localizados nove resíduos de aminoácidos antes do C-terminal. A região de resíduos de leucina é importante para homo e heterodimerização das proteínas antes de se ligarem ao DNA (Schutze *et al.*, 2008; Llorca *et al.*, 2014).

Alguns fatores de transcrição bZIP são descritos por serem responsivos aos hormônios de defesa SA e MeJA, e infecção por diferentes grupos de patógenos, em pimentão, soja, tabaco, *Lilium regale*, mandioca e *N. benthamiana* (Droge-Laser *et al.*, 1997; Heinekamp *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017) (Tabela 1).

O fator de transcrição bZIP, G/HBF1 de soja, é fosforilado e ativado na presença de elicitores e patógenos. G/HBF1 é capaz de se ligar aos *cis*-elementos G-Box (CACGTG) e H-BoxIII (TCACCTACCCTA) do promotor do gene *CHS15* (chalcona sintase), promovendo a ativação da transcrição desse gene em resposta a estresse biótico (Droge-Laser *et al.*, 1997). A proteína SBZ1 de soja é capaz de se ligar ao promotor dos genes *CHS1* e *CHS7*, entretanto, ao contrário de G/HBF1, a atividade de ligação ao DNA de SBZ1 não é regulada por fosforilação (Yoshida *et al.*, 2008). *BZII* de *N. tabacum* que apresenta 97% de identidade a nível de DNA com *G/HBF*, é capaz de se ligar ao *cis*-elemento G-box de *CHS in vitro*. Entretanto, a superexpressão deste transfator não altera a expressão do gene *CHS15*. Ao contrário dos *bZIPs* de soja relatados, *BZII* não é um regulador da via de fenilpropanoides (Heinekamp *et al.*, 2002).

Tabela 1. Fatores de transcrição bZIPs que são responsivos à infecção por patógenos e / ou hormônios, e os processos fisiológicos envolvidos

Genes	Organismos	Indutores	Função	Referência
<i>CabZIP1/2</i>	<i>C. annuum</i> L.	ET, SA, MeJA e infecção por patógeno	Redução na taxa de crescimento vegetativo. Resistência a estresses biótico e abiótico	Lee <i>et al.</i> , 2006; Lim <i>et al.</i> , 2015
<i>AtbZIP10</i>	<i>A.thaliana</i>	Não caracterizado	Regulador positivo de HR, morte celular e resposta de defesa basal	Kaminaka <i>et al.</i> , 2006
<i>TGAs</i>	<i>A.thaliana</i>	SA	Indução de genes PR	Després <i>et al.</i> , 2000
<i>BZI-1</i>	<i>N. tabacum</i>	Não caracterizado	Sinalização de auxina e defesa vegetal	Kuhlmann <i>et al.</i> , 2003
<i>G/HBF-1</i>	<i>G. max</i>	Não caracterizado	Regulação da expressão de genes de defesa	Dröge-Laser <i>et al.</i> , 1997
<i>SBZI</i>	<i>G. max</i>	Não caracterizado	Regulação da expressão de genes de defesa	Yoshida <i>et al.</i> , 2008
<i>VvbZIP23</i>	<i>Vitis vinifera</i>	ABA, ET, JA e SA.	Regulação de resposta a estresses abióticos e bióticos	Tak e Mhatre., 2013
<i>SiAREB1</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	ABA	Resposta a patógenos	Orellana <i>et al.</i> , 2010
<i>CabZIP63</i>	<i>C. annuum</i>	SA, MeJA, ETH, ABA, resposta a <i>Ralstonia solanacearum</i>	Regulação de resposta a estresses abióticos e bióticos	Shen <i>et al.</i> , 2016
<i>GmZIP105, GmbZIPE1, GmZIPE2, GmbZIP62</i>	<i>G.max</i>	AS, JÁ, Infecção com FAS	Resposta a patógenos	Alves <i>et al.</i> , 2015
<i>MebZIP3 e MebZIP5</i>	<i>Manihot esculenta</i>	SA, H ₂ O ₂ , Flg2 e infecção por bactéria	Resistência a patógenos	Li <i>et al.</i> , 2017
<i>NbbZIP28</i>	<i>N. tabacum</i>	CMV e TMV	Resistência à infecção viral	Shen <i>et al.</i> , 2017
<i>LrbZIP1</i>	<i>Lilium regal Wilson</i>	SA, JA, ET, H ₂ O ₂ e <i>F. oxysporum</i>	Resistência a <i>F. oxysporum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014

Tabela adaptada de Alves *et al.*, 2013.

O fator de transcrição LrbZIP1 de *L. regale* tem a expressão induzida após o tratamento com SA, JA, Etileno, H₂O₂ e infecção por *Fusarium oxysporum f. sp. lilii*. A expressão transgênica de *LrBZIP1* em tabaco aumenta a resistência da planta a infecção com *F. oxysporum* (Zhang *et al.*, 2014). Enquanto, o gene *CcPPI* de pimentão, responsivo a infecção pelo PMMV, *P. syringae pv. syringae*, e *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, mas não é induzido por SA, etileno e MeJA exógeno (Lee *et al.*, 2002). Os genes *CabZIP1* e *CabZIP2* são responsivos a infecção com *X. campestris pv. vesicatoria* (Lee *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2015). O silenciamento do *CabZIP2*, por meio de VIGS, aumenta a suscetibilidade do pimentão à infecção, enquanto mutantes de arábido superexpressando o mesmo gene são mais resistentes à *Pseudomonas* (Lim *et al.*, 2015).

Em plantas de trigo (*Triticum aestivum*), *TabZIP1* é induzido nos estágios iniciais da interação incompatível com *Puccinia striiformis f. sp. tritici* (Zhang *et al.*, 2008). O gene *GmbZIP105* é induzido durante interações compatíveis e incompatíveis entre soja e o fungo *P. pachyrhizi*. Entretanto, os genes *GmbZIPE1*, *GmbZIPE2* e *GmbZIP62* são induzidos apenas em plantas suscetíveis (Alves *et al.*, 2015). A elevada expressão de *TabZIP1* no início da infecção, indica uma possível função no reconhecimento e defesa contra a penetração do fungo em trigo (Zhang *et al.*, 2008).

2.4. Família gênica DRM1/ARP

A alteração nos níveis de auxinas leva à modificações na expressão de um grupo de genes responsivos a esta classe de hormônio (Shi *et al.*, 2013). Estes genes possuem em seus promotores os *cis*-elementos AuxREs. Os genes de resposta primária são induzidos rapidamente, geralmente entre cinco a sessenta minutos após tratamento (Abel e Theologis, 1996). Entre eles, estão as famílias multigênicas *AUX/IAA*, *GH3*, e *SAURs* (Hagen e Guilfoyle, 2002). Outra família de genes responsivos a auxina é a *DRM1/ARP*, entretanto, a análise de expressão desses genes em resposta a auxina sugerem que sejam genes de resposta secundária, como verificado em *Elaeagnus umbellata*, onde o gene *EuNOD-ARP* foi induzido seis horas após o tratamento com auxina (Kim *et al.*, 2007).

A família DRM1/ARP foi descrita até o momento somente em plantas superiores (Park e Han, 2003), e tendo membros relatados em diversas espécies, tais como, ervilha (Stafstrom *et al.*, 1998), tabaco (Steiner *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2014), maçã (Lee *et al.*, 1993), *Elaeagnus umbellata* (Kim *et al.*, 2007), amendoim (Govind *et al.*, 2009; Morgante *et al.*, 2013), soja (De Sa *et al.*, 2012), couve chinesa (Lee *et al.*, 2013), pera

(Salvianti *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013), morango (Chen *et al.*, 2016; Reddy e Poovaiah, 1990), pimentão (Jung e Hwang, 2000), kiwi (Wood *et al.*, 2013), *A. thaliana* (Tatematsu *et al.*, 2005; Rae *et al.*, 2014;), tomate (Vriezen *et al.*, 2008), sorgo (Kebrom *et al.*, 2006; Kebrom *et al.*, 2010), trigo (Kebrom *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014), batata (Gangadhar *et al.*, 2014), *Paeonia sp* (Huang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2015) e pinus (Ramos *et al.*, 2016).

Embora, a função molecular dos genes *DRMI/ARPs* ainda não seja bem compreendida, eles são associados a diversos processos fisiológicos em plantas tais como a manutenção de dormência de gemas axilares (Stafstrom *et al.*, 1998; Kebrom *et al.*, 2006; Kebrom *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2013), a repressão do desenvolvimento de frutos, hipocótilo e grão de pólen (Reddy e Poovaiah, 1990; Steiner *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007), a resistência a estresses abióticos e bióticos (Chakravarthy *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014; Rae *et al.*, 2014) (Tabela 2).

Tabela 2. Proteínas da família DRM1/ARPs e os possíveis processos fisiológicos envolvidos.

Genes	Organismos	Processo fisiológico	Referências
<i>AsARP</i>	<i>Arachis stenosperma</i>	Resposta de defesa a patógenos	Guimaraes <i>et al.</i> , 2015
<i>AtDMR1/2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Manutenção de dormência em gemas. Resposta a estresses	Tatematsu <i>et al.</i> , 2005; Rae <i>et al.</i> , 2014; Poupin <i>et al.</i> , 2016
<i>Ade-DMR1-IG</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	Manutenção de dormência em gemas	Wood <i>et al.</i> , 2013
<i>BrARP1/BrDRM1</i>	<i>Brassica rapa</i>	Dormência de gemas, redução do crescimento, estresses abióticos	Lee <i>et al.</i> , 2013
<i>EuNOD-ARP1</i>	<i>Elaeagnus umbellata</i>	Resposta a infecção pelo simbionte <i>Frankia</i>	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>SAR5</i>	<i>Fragaria ananassa</i>	Repressão do desenvolvimento de frutos	Reddy; Poovaiah, 1990; Chen <i>et al.</i> , 2016
<i>MdAPI</i>	<i>Malus domestica</i>	Maturação de frutos	Lay-Yee, 1993
<i>NtARP1/GERI1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Repressor de crescimento e promotor de resistência a doença	Zhao <i>et al.</i> , 2014
<i>NtARPL1</i>	<i>N.tabacum</i>	Repressão da maturação do pólen	Steiner <i>et al.</i> , 2003
<i>PpARP1/2</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Desenvolvimento de frutos	Shi <i>et al.</i> , 2013
<i>PsDRM1/2</i>	<i>Pisum. sarivum</i>	Manutenção da dormência em gemas	Stafstrom <i>et al.</i> , 1998
<i>PbARP</i>	<i>Pyrus bretschneideri</i>	Abcissão do cálice	SU <i>et al.</i> , 2015
<i>PlARP</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>	Inibição da ramificação lateral	Zhao <i>et al.</i> , 2015
<i>PsARP</i>	<i>Paeonia suffruticosa</i>	Liberação de dormência em gemas	Huang <i>et al.</i> , 2008
<i>RpARP</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Elongação de raiz	Park e Han, 2003
<i>SiDRM1</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Manutenção da dormência em ovários não polinizados	Vriezen <i>et al.</i> , 2008
<i>StARP1</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Resposta a estresses abióticos	Gangadhar <i>et al.</i> , 2014
<i>SbDRM1</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Manutenção de dormência em gemas axilares	Kebrom <i>et al.</i> , 2006; Kebrom <i>et al.</i> , 2010
<i>TaARP1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Estresses bióticos	Song <i>et al.</i> , 2015
<i>BnARP1</i>	<i>Brassica napus</i>	Estresses bióticos	Wu <i>et al.</i> , 2017

2.4.1. DRM1/ARP e estresse biótico

Genes homólogos da família DRM1/ARP foram estudados anteriormente em algumas espécies de plantas em resposta à estresse biótico, tais como em resposta à infecções por bactérias (Jung e Hwang, 2000; Poupin *et al.*, 2016), fungos (Kim *et al.*, 2007; Morán-Diez *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014), nematóides (Proite *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010; De Sa *et al.*, 2012; Morgante *et al.*, 2013); vírus (Wen *et al.*, 2013); e ataque de insetos herbívoros (Salvianti *et al.*, 2008).

O gene *NbARPI* é induzido em *N. benthamiana* infectada com os vírus HLSV e TMV (Wen *et al.*, 2013). A expressão do gene *ARP* é induzida em *Pyrus communis* após a infestação com o inseto *Cacopsylla pyri* (Salvianti *et al.*, 2008).

O gene *EuNOD-ARPI* é mais expresso em nódulos radiculares de *E. umbellata* infectados com o simbionte actinomiceto *Frankia*, em comparação ao mesmo órgão não infectado e em folhas (Kim *et al.*, 2007). A expressão dos genes *AtDRM1* e *AtDRM2* é induzido em *A. thaliana* após 24h de inoculação com o fungo *Trichoderma harzianum* (Morán-Diez *et al.*, 2012). *AtDRM2* também é fortemente induzido em resposta a infecção pela rizobactéria benéfica *Burkholderia phytofirmans* PsJN em raízes e parte aérea de *A. thaliana* (Poupin *et al.*, 2016). O acúmulo de transcrito de *ARP* ocorreu em folhas e caules de pimentão (*C. annuum*) infectados com as bactérias *Xanthomonas campestris* e *Phytophthora capsici*, o que não foi observado nos mesmos órgãos não infectados (Jung e Hwang, 2000).

A expressão do gene *ARP* é reprimida em interações compatíveis entre amendoim (*Arachis hypogaea*) e o nematóide da galha (*Meloidogyne arenaria*), em estágio mais avançado da infecção (Guimarães *et al.*, 2010). Por outro lado, durante a fase inicial da interação incompatível entre o amendoim resistente (*Arachis stenosperma*) e *M. arenaria*, ocorre uma indução na expressão de genes *DRM/ARPs*. O mesmo perfil de expressão foi observado em interação entre a cultivar resistente PI 595099 de *G. max* e *Meloidogyne javanica* (Proite *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010; De Sa *et al.*, 2012; Morgante *et al.*, 2013;).

A expressão do gene *TaARPI* é induzida em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) inoculadas com o fungo causador do oídio (*Blumeria graminis* f. sp. tritici). Interessantemente, o silenciamento do gene *TaARPI* resulta em maior suscetibilidade a esse patógeno aos 10 dias pós inoculação, quando comparados com seus respectivos controles (Song *et al.*, 2014). Resultado similar, pode ser observado com o silenciamento

de *NbARP1/GERII*, onde as plantas silenciadas são mais suscetíveis a infecção pelo TMV, pela bactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovora*, e pelo oomiceto *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Por outro lado, as plantas P35S:ARP1 são mais resistentes a infecção por esses mesmos patógenos (Zhao *et al.*, 2014).

O gene *ARP/GERII* parece atuar como um mediador entre o crescimento e a resistência a patógenos. O silenciado deste gene resulta em aumento do crescimento vegetativo e em maior expressão dos genes marcadores de crescimento *NtEXP1* e *NtEXP2*, e do fator de transcrição *ARF8*. Por outro lado, a superexpressão de *ARP/GERII* as plantas causa comprometimento no crescimento vegetativo, redução da expressão de *ARF8*, *NtEXP1* e *NtEXP2*, e indução de *NPR1*. Portanto, esses resultados sugerem que o gene *NtARP1/GERII* modula de alguma forma a expressão de *ARF8* e *NPR1*, e assim coregulam assim o crescimento e a resistência à patógenos (Zhao *et al.*, 2014).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização funcional do fator de transcrição GmbZIP105 e da proteína GmARP15g em resposta a patógeno em soja.

3.1. Objetivos específicos

- 3.1.1. Confirmar a interação entre as proteínas GmbZIP105 e GmARP15g em ensaios de duplo híbrido de leveduras.
- 3.1.2. Superexpressar o gene *GmbZIP105* em protoplastos de soja.
- 3.1.3. Identificar os genes alvos do fator de transcrição GmbZIP105.
- 3.1.4. Identificar possíveis alvos de interação da proteína GmARP15g por meio de ensaios de duplo híbrido de leveduras.
- 3.1.5. Avaliar o efeito funcional dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* em resposta a infecção com o fungo *P. pachyrhizi*.
- 3.1.6. Identificar os genes da família DRM1/ARP em *G. max*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *A. thaliana* e *B. rapa* por meio de análises *in silico*.
- 3.1.7. Avaliar a expressão dos grupos da família DRM1/ARP em plantas de soja tratadas com IAA e MeJA.
- 3.1.8. Avaliar a expressão dos grupos da família DRM1/ARP em plantas de soja suscetíveis infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*.
- 3.1.9. Avaliar a expressão de genes envolvidos com o metabolismo de auxinas em suscetíveis infectadas com *P. pachyrhizi*.
- 3.1.10. Avaliar a expressão dos grupos da família DRM1/ARP em raízes de soja suscetíveis infectadas com o nematoide *M. javanica*.
- 3.1.11. Silenciar os genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* em plantas de soja utilizando VIGS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Clonagem dos genes *GmARP15g* e *GmbZIP105* em vetores de expressão

As CDS dos genes *GmbZIP105* (Glyma.03G247100) e *GmARP15g* (Glyma.15G076500) foram obtidas no banco de dados Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Foram adicionados aos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* parte das sequências attB 1e attB 2, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Oligonucleotídeos específicos para amplificação e clonagem dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* em vetores de expressão.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Fw-GmbZIP105	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAATGAAATTCAAATACT
GmbZIP105-Rv	AGAAAGCTGGGTCGCGGCCGCAAGCTTTCAATTAGAAGGAGTTCCAC
Fw-GmARP15g	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGTTCTGCTAGAGAGAAGCT
Gm-ARP15g-Rv	AGAAAGCTGGGTTCTCAGCGGTGCCTGCTTCTGG
Fw-pDONR201	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
Fw-PDEST22	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG
pDEST22-RV	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-pDEST32	TATAACGCGTTTGGGAATCACT
pDEST32-RV	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
Fw-pEXPAD-502	CGGTCCGAACCTCATAACAACCTC
pEXPAD-502-RV	GTAAATTTCTGGCAAGGTAGAC

Os genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* foram amplificados a partir de cDNA de folhas de soja cultivar CD 206, por meio de PCR. Os fragmentos obtidos foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* PCR (Promega), segundo as especificações do fabricante. Os fragmentos foram introduzidos no vetor de entrada do sistema gateway pDONR-201, por meio de uma reação de recombinação entre os sítios attB e attP, catalisada pela enzima *BP clonase* (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. As reações foram utilizadas para transformação via choque térmico de células da cepa DH5 α de *Escherichia coli*.

A presença dos plasmídeos recombinantes foi confirmada por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos Fw-pDONR-201 e o *reverse* específico de cada gene (Tabela 3). Os clones positivos foram submetidos a extração de DNA plasmidial, utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram sequenciados para confirmar a presença dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g*.

4.2. Superexpressão de do fator de transcrição GmbZIP105 em protoplastos de soja

4.2.1 Obtenção e transformação de protoplastos de soja

O gene *GmbZIP105* foi clonado no vetor pCAMBIA-YFP-pnos 1300 por meio de recombinação com vetor pDONR201, catalisado pela enzima *LR clonasse* (Invitrogen), para obtenção da construção pYFP-*GmbZIP105*. A reação de recombinação foi realizada segundo as instruções do fabricante.

Os protoplastos foram obtidos de folhas coletadas de plantas de soja cultivar CD 206 em estádio V3-V5. As folhas foram higienizadas com água sanitária 10%, álcool 70% e água destilada. Após a fragmentação, o tecido vegetal foi incubado em solução enzimática ((celulase 0,5% (p/v), celobiase 0,25% (p/v), pectoliase Y23 0,1% (p/v), manitol 0,6M; MES 20 mM; pH 5,5)), sob agitação (30 rpm) à 30°C por 5 horas no escuro. A solução resultante foi filtrada em peneira 0,65µm e lavada por duas vezes com solução de lavagem (Manitol 0,6M, MES 20mM, pH 5,5). Os protoplastos foram recuperados por centrifugação à 700 xg por 3 minutos. Lavados novamente com solução de eletroporação (HEPES-KOH 25mM pH 7,2; KCl 10mM, MgCl₂ 15mM, Manitol 0,6M), e coletados por centrifugação à 700 xg por 3 minutos. O *pellet* foi mantido no gelo por 30 minutos.

Os protoplastos foram transformados por eletroporação com 10 µg de DNA de pYFP-*GmbZIP105* ou pYFP vazio e 40 µg DNA de esperma de salmão, em um volume final de 800µL, a 25µF de capacitância e 2500 volts (Gene Pulser- BIORAD). Os protoplastos foram mantidos no gelo por 15 minutos e inoculados em 8 mL de meio MS pH5,5, suplementado com 0,6 M de manitol e 50 µg/mL de ampicilina. Os transformantes foram mantidos no escuro por 36 horas. Após o período de expressão, os protoplastos foram coletados por centrifugação a 700 x g por 3 minutos. O material foi imediatamente destinado a extração de RNA.

4.2.2 Extração, quantificação e qualidade do RNA

O RNA total foi extraído utilizando o kit *RNeasy Plant Mini* (Qiagen), seguindo as instruções fabricante. A concentração e a qualidade do RNA foram estimadas em gel agarose 1,5% corados com 0,1µg/mL de brometo de etídeo.

Os RNAs com qualidade e quantidade apropriado foram utilizados para produzir *pools* de RNA, sendo que cada *pool* representa RNA obtido de três transformações

independentes. Foram analisados quatro *pools*, sendo dois *pools* de amostras superexpressando *GmbZIP105* e outros dois do controle com o vetor vazio. Essas quatro amostras de RNAs foram analisados no *Agilent 2100 Bioanalyser System* com o kit *Agilent RNA 6000 Nano* (Agilent), seguindo as especificações do fabricante. E quantificado no Qubit Fluorometer utilizando o kit *Qubit RNA BR Assay* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

4.2.3 Tratamento com DNase I, síntese de cDNA e análises de qRT-PCR

O RNA total (2µg) extraído de protoplastos de soja foi tratado com DNase I (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. A eficiência do tratamento com DNase I foi confirmada por meio de PCR utilizando o oligonucleotídeos do gene endógeno ELF1A (Tabela 4). O RNA livre de DNA foi destinado a síntese de cDNA com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. A eficiência da síntese de cDNA foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos ELF1A (Tabela 4). O cDNA foi diluído em água ultrapura tratada com DEPC na proporção de 1:10.

As reações de qRT-PCR foram realizadas segundo os manuais da Applied Biosystems e conduzidas no termociclador modelo *Step one* da Applied Biosystems. As reações foram realizadas em um volume total de 10 µL: 5 µL de *Power SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de cDNA e 4µL de oligonucleotídeos (concentração variou para os diferentes pares de oligonucleotídeos). As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Para todos os oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão gênica por meio de qRT-PCR foi determinada a eficiência da reação. Para determinar a condição ideal de eficiência da reação, foram testadas diferentes concentrações para cada conjunto de oligonucleotídeos, utilizando 100 ng de cDNA de planta sadia ou 50 ng de DNA genômico em cada reação. A curva padrão foi realizada com a concentração que resultou em maior amplificação. Desta forma, para obter curva padrão foram realizadas reações utilizando-se cDNA de plantas de soja sadia previamente obtido em 7 diluições seriadas de 1:10 partindo de 100 ng. Alguns oligonucleotídeos em que a eficiência não ficou adequada utilizando cDNA, realizou-se a curva padrão com DNA genômico. Neste caso, realizou-se uma curva padrão utilizando DNA genômico do cultivar CD 206, utilizou-se

com diluições em série 1:50, partindo de 50 ng. A partir da curva padrão obtive-se o coeficiente angular da regressão linear obtida (*slope*), e este foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação da reação, conforme equação: $E = (10^{-1/slope} - 1)$.

Para validar a superexpressão dos genes em protoplastos de soja, quantificou-se a expressão do gene *GmbZIP105* e *GmUBC4*. A expressão do gene *GmUBC4* foi utilizado para normalizar os dados de qRT-PCR (Tabela 4). Para avaliar se o gene *GmbZIP105* foi superexpresso em relação ao controle (protoplastos de soja transformado com o vetor vazio), utilizou-se o teste t. Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc.).

Tabela 4. Oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

ID (Glyma)	Nome do gene	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Glyma.03G247100	transcription factor bZIP105	Fw-GmbZIP105	GTTGGGAGGCATTTCTTCAA
		GmbZIP105-Rv	CCAGGCTAGCCACTCTATGC
Glyma.18G44850	Ubiquitin-conjugating enzyme Enzyme E2 (family UBC4)	Fw-GmUBC4	GAGCGAGCAGTTTCAGAC
		GmUBC4-Rv	CATAGGAGGGACGATACG
Glyma.05G24110	Translation elongation factor 1-alpha	Fw-GmELF1A	GACCTTCTTCGTTTCTCGCA
		GmELF1A-Rv	CGAACCTCTCAATCACACGC
		Library Quantification Primer 1	AATGATACGGCGACCACCGA
		Library Quantification Primer 2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGA
Glyma.06G224200	Thylakoid lumenal 16.5 kDa protein, chloroplastic	FW Glyma.06G224200	AGCACGGTTGGTCAAGCACT
		RV Glyma.06G224200	CAATCTGCGTCCGCGTTTCC
Glyma.13G056000	Transcription factor TCP13	FW Glyma.13G056000	TGGTGTGTCTCCTCATGGA
		RV Glyma.13G056000	TGCATTCATCTCCATTGCTGCA
Glyma.05G128000	Chlorophyll a/b-binding protein/light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1 (LHCB1)	FW Glyma.05G128000	GTGGCAGCTTTGACCCATTG
		RV Glyma.05G128000	ATCTCCCGTTCTTGAGTTTCT
Glyma.04G050400	Ferrochelatase-2, chloroplastic/ ferrochelatase-1, chloroplastic/ mit chondrial	FW Glyma.04G050400	AGATGACCAGGCACTTGCAATT
		RV Glyma.04G050400	ACCAGTATCGCATCCCAACG
Glyma.01G180800	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like /photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1 (psbO)	Fw Glyma.01G180800	TCCCTTAAGCCCGATCTCAA
		RV Glyma.01G180800	CACTCGCTCCAGAAACAACGAG
Glyma.04G020300	Plastocianina	Fw Glyma.04G020300.1	TCTCTGGCTTTCGTTCCCAA
		Rv Glyma.04G020300.1	TCTCGTCCTCGTCGAACACA

4.2.4 Construção e quantificação das bibliotecas

As bibliotecas de RNAseq foram construídas a partir de 1µg de RNA total livre de DNA, seguindo o manual *TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Low throughput* (Illumina).

As bibliotecas de RNAseq foram quantificadas no *Qubit Fluorometer* utilizando o kit *dsDNA High Sensitivity Assay* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A fragmentação média das bibliotecas foi analisada no *Agilent 2100 Bioanalyser System* utilizando o kit *Agilent High Sensitivity DNA* (Agilent), seguindo as especificações do fabricante. A quantificação das bibliotecas foi validada com o kit *Kapa Library Quantification Illumina Platforms* (Kapa Biosystems), seguindo as especificações do fabricante, utilizando o equipamento *Step one* da Applied Biosystems. Utilizou-se as diluições de 1:5000, 1:50000 e 1:500000, das bibliotecas em Tris-HCl 10mM e 0,1 % de *tween 20*, para o qRT-PCR. Para os padrões do kit, obteve-se uma curva de diluição variando de 20 a 0,0002 pM. A quantificação consiste na amplificação via qRT-PCR, utilizando oligonucleotídeos (Tabela 4) que se ligam a sequências consenso dos adaptadores de cada fragmento da biblioteca. Desta forma, é possível quantificar as bibliotecas baseado nos valores de Ct dos padrões, e verificar se os fragmentos possuem adaptadores ligados.

4.2.5 Sequenciamento das bibliotecas de cDNA

As bibliotecas foram diluídas com Tris-HCl 10mM e 0,1 % de *tween 20* para a concentração de 10 nM. Em seguida efetuou-se uma segunda diluição para 2 nM, e esta foi utilizada para produzir um *pool* com todas as bibliotecas utilizada no sequenciamento. No total foram sequenciadas quatro bibliotecas de soja (controle.1, controle.2, bZIP105.1 e bZIP105.2), a proporção de cada biblioteca foi determinada de acordo com tamanho do genoma da espécie. As bibliotecas foram desnaturadas e diluídas segundo o guia *Denaturing and Diluting Libraries for the NextSeq™ 500* (Illumina). Foi aplicado em uma *flowcell* 13pM do *pool* de bibliotecas. O sequenciamento das bibliotecas *paired end* foi realizado no modo *Rapid* utilizando os *Kits TruSeq Rapid SBS (200 Cycles)* e *TruSeq® PE Cluster v3*, no equipamento modelo *Hiseq 2500 da Illumina* do Núcleo de Análises de Biomoléculas –UFV.

4.2.6 Análises de qualidade do conjunto de dados do sequenciamento

Após o término da corrida, a intensidade de sinal derivadas do sequenciador foi convertida em arquivos formato FASTq, e os dados foram destinados para análises mais detalhadas de qualidade. Os conjuntos de dados brutos em formato FASTq, referentes as quatro bibliotecas controle.1, controle.2, bZIP105.1 e bZIP105.2, foram transferidos para o computador Júpiter do Diretoria de Tecnologia e Informação da UFV.

Primeiramente, realizou-se um controle de qualidade do conjunto de dados brutos não agrupados (Lane 1- R1 e R2, e Lane 2- R1 R2) de cada biblioteca, utilizando o programa FASTQC (Andrews *et al.*, 2010). Para estas análises definiu-se o valor de *Phred* 15.

Em seguida, utilizou-se o programa Trimmomatic 0.36 para trimagem das *reads* (Bolger *et al.*, 2014). A trimagem elimina sequências de baixa qualidade ou indesejadas, como por exemplo, os adaptadores adicionados durante a construção das bibliotecas, ou *reads* de tamanho reduzido. Os parâmetros utilizados no pbs do Trimmomatic foram: PE; *Leading*:10; *Trailing*:10; *Slidingwindow*:3:15; *Minlen*:25.

- PE: *reads paired end*;
- *Leading*: limiar de qualidade para remoção de nucleotídeos da extremidade 5' ;
- *Trailing*: limiar de qualidade para remoção de nucleotídeos da extremidade 3' ; -
- *Minlen*: elimina reads abaixo do comprimento mínimo;

Após a trimagem no Trimmomatic, estes dados foram novamente avaliados no programa FASTQC, a fim de verificar se as *reads* “trimadas” estavam adequadas para as análises posteriores.

4.2.7 Montagem dos transcritos por referência

O genoma de *G.max* GCA 000004515.3 Glycine-max-v2.0 depositado no NCBI (Benson *et al.*, 2014), foi utilizado para montagem do transcriptoma por referência. Para montagem dos transcritos utilizou-se o programa tophat2 2.1.1 (Kim *et al.*, 2013). O tophat2 requer o programa bowtie2 /2.2.8 (Langmead *et al.*, 2009) para alinhamento das *reads* no genoma de soja. Para utilizar o programa bowtie2, o genoma foi indexado pela ferramenta bowtie2-build.

Em seguida foi utilizado o programa Cufflinks 2.2.1 para montagem dos transcritos (Trapnell *et al.*, 2012). Os dados foram normalizados utilizando FPKM. E os

genes mais expressos e menos expressos, foram definidos pelo \log_2 do *fold change* do FPKM da bZIP105 dividida pelo do controle. A identificação dos genes foi realizada através de buscas nos bancos de dados NCBI (Benson *et al.*, 2014) e do Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012).

4.2.8 Validação dos genes relacionados com a fotossíntese identificados na triagem alvo específicos do fator de transcrição GmbZIP105

Dentre os genes com maior *fold change* alguns foram selecionados para validação por qRT-PCR. A sequência codificadoras dos genes foram obtidas no Phytozome. Os oligonucleotídeos foram construídos utilizando os programas Primer3 plus (Untergasser *et al.*, 2007) e oligo explorer. A especificidade dos oligonucleotídeos foi avaliada no programa e-PCR (Rotmistrovsky *et al.*, 2004). As sequências dos oligonucleotídeos estão representados na Tabela 4. Os oligonucleotídeos foram testados quanto a eficiência de reação como descrito no item 4.2.3 do Material e Métodos.

4.3 Duplo híbrido em leveduras

4.3.1 Clonagem dos genes *GmARP15g* e *GmbZIP105* em vetores de expressão

Para o experimento de duplo-híbrido em leveduras, os genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* foram clonados no vetor pDEST32, produzindo as fusões pBD-*GmbZIP105* e BD-*GmARP15g*, e nos vetores pDEST22 e pEXPAD-502 produzindo as fusões pAD-*GmbZIP105* e pAD-*GmARP15g*, respectivamente. As reações de recombinações entre os vetores de entrada e os vetores de destinos foram catalisadas pela enzima *LR clonase* (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. As reações de recombinação foram utilizadas para transformação via choque térmico da cepa DH5 α . A presença do plasmídeo com o gene foi confirmada por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos Fw-pDEST32, Fw-pEXPAD-502 ou pDEST22 e o *reverse* específico de cada gene (Tabela 3).

4.3.2 Transformação de leveduras com BD-GmbZIP105 e AD-GmARP15g e avaliação da atividade do gene repórter *HIS3*

Uma colônia isolada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, LYS2:GAL1UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1, GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ), foi inoculada em 5 mL de meio YPD-A, e incubada a 30°C com a agitação de 180 rpm, por 16 horas. Todo o volume do pré-inoculo foi transferido para 70 mL de meio YPD-A e, incubado na mesma condição mencionada acima até atingir a OD₆₀₀=0,6. As células coletadas por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos e lavadas duas vezes com água estéril. Ao *pellet* foi adicionado o mix de transformação: PEG 50%, acetato de lítio 1 M, 2 mg de DNA fita simples de esperma de salmão (ssDNA) e 25µg de cada vetor. Para o ensaio de interação entre as proteínas GmbZIP105 e GmARP15g, os seguintes duplo-transformantes foram obtidos: pBD-vazio + pAD-vazio, pBD- vazio + pAD-GmARP15g, pBD-GmbZIP105 + pAD-vazio, pBD-GmbZIP105 + pAD-GmARP15g, pAD- BD-GmARP15g + pAD-vazio, pBD-GmARP15g +pAD-GmbZIP105 e pBD-GmbZIPE2+ pAD-GmbZIPE2 (controle positivo). Após a adição da mistura de transformação, as células foram mantidas no banho-maria à 42°C durante 50 minutos. Após este período, todo o conteúdo foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos e o *pellet* foi lavado em água destilada estéril. Essa etapa foi repetida por 2 vezes, sendo que a última vez o *pellet* foi lavado em meio seletivo com SD-Leu-Trp. Os transformantes foram plaqueados no meio SD-Leu-Trp com ampicilina 50µg/mL. As placas foram incubadas à 30°C por 3 dias.

A confirmação do duplo transformante foi realizada por meio de PCR de DNA plasmidial, utilizando os oligonucleotídeos específicos para os vetores (Tabela 3). Os clones positivos foram utilizados para ensaio de prototrofia da histidina no meio seletivo SD-Leu-Trp-His suplementado com 3AT. As culturas na OD₆₀₀=0,5 foram diluídas para 0,05 e 0,005.

4.3.3 Triagem para identificação de parceiros de interação com a proteína GmARP15g

A triagem foi realizada utilizando como isca a fusão pBD-GmARP15g e como presa uma biblioteca de cDNA de soja, que produz uma fusão pAD-cDNA (Alves *et al.*, 2011).

Uma colônia de levedura AH109 previamente transformada com a construção pBD-GmARP15g foi crescida por 16 horas, em 5 mL de meio SD-Leu com 50µg/ml de ampicilina. O pré- inóculo foi transferido para 70 mL de meio SD-leu e incubado a 30°C a 180 rpm até atingir a OD₆₀₀= 0,6. O protocolo de transformação de levedura está descrito no item anterior, com algumas modificações. Ao mix de transformação, nesse caso, foi adicionado 50 µL da biblioteca de cDNA. Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo SD-Leu-Trp-His com 50µg/ml, e incubados por 7 dias a 30 °C.

As colônias foram transferidas para meio SD-Leu-Trp-His com 2,5mM de 3AT. Os clones positivos para esse ensaio foram utilizados para ensaio de prototrofia em histidina, juntamente com as leveduras controles: pBD-vazio + pAD-vazio, pBD- vazio + pAD-GmARP15g, pBD-GmARP15g + pAD-vazio, e pBD-GmbZIPE2 + pAD-GmbZIPE2.

As colônias positivas no ensaio de prototrofia em histidina foram submetidas a extração de DNA plasmidial utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo as especificações do fabricante. A confirmação da presença dos plasmídeos foi realizada por meio de PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3. As bandas referentes as colônias isoladas no duplo híbrido foram purificadas com o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System PCR* (Promega), segundo as instruções do fabricante. Os fragmentos de PCR foram sequenciados.

As seqüências de DNA obtidas no sequenciamento foram utilizadas para buscas no blastN no NCBI (Benson *et al.*, 2014) e Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012), com objetivo de identificar os parceiros de interação de GmARP15g.

4.4 Análise *in-silico* e perfil de expressão dos genes *DRM1/ARP* em soja

4.4.1 Identificação dos genes *DRM1/ARP* em quatro espécies de leguminosas

A seqüência de aminoácidos da proteína AtDRM1 (At1g28330) de *A. thaliana* foi utilizada no BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) contra o proteoma dessa espécie depositado no Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). As seqüências de proteínas de *A.thaliana* obtidas após essa busca foram utilizadas para identificar todas as possíveis proteínas DRM1/ARP nos quatro genomas das leguminosas: *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt), *Phaseolus vulgaris* (Pv) e *Trifolium pratense* (Tp) e na espécie da família Brassicaceae, *B.rapa* (Br), utilizando o BLASTP no Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Para todas as

buscas foi definido um *e-value* de corte de $< 10^{-10}$. A presença do domínio *dormancy/auxin associated protein*, característico da família, foi confirmada no banco de dados *on-line* PFAM (Finn *et al.*, 2014), com *e-value* de corte $< 10^{-5}$. O ponto isoelétrico teórico e a massa molecular das sequências de aminoácidos foram calculados pelo ExPASy com a ferramenta *Compute pI/Mw* (Artimo *et al.*, 2012)

4.4.2 Alinhamento de sequências e análise filogenética

A partir do alinhamento realizado, gerou-se uma matriz de distância que é inversamente proporcional a porcentagem de identidade. Reduziu-se a dimensionalidade utilizando a técnica MDS implementado na plataforma R, representando cada proteína em um plano cartesiano, onde as distâncias entre as proteínas são proporcionais a diferenças entre as sequências de aminoácidos (Felsenstein, 1989). Os agrupamentos foram identificados no algoritmo K-Means (Steinley, 2006) implementado na plataforma R, com os critérios $K=3$, ciclos =1000 (R Development Core Team, 2011). A escolha de 3 grupos foi realizada após a conferência visual com MDS plotado.

As sequências de aminoácidos dos três grupos foram alinhadas utilizando o programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método *neighbor-joining*, com *bootstrap* de 1000.

4.4.3 Desenho de oligonucleotídeos dos grupos específicos de DRM1/ARP em soja

As sequências CDS dos representantes de cada grupo foram alinhadas utilizando o programa online clustal Omega (Sievers e Higgins, 2014). Foi selecionado uma região consenso entre todas as sequências para desenho dos oligonucleotídeos, sendo que essa região foi inferior a 200 pb. As sequências dos oligonucleotídeos foram avaliadas no programa oligo explorer quanto a formação de homodímeros ou heterodímeros. A especificidade dos oligonucleotídeos foram avaliadas no programa Electronic PCR (e-PCR) (Rotmistrovsky *et al.*, 2004). Os oligonucleotídeos dos genes de referência foram sintetizados de acordo com Le *et al.* (2012) e Miranda *et al.*, (2013). As sequências dos oligonucleotídeos estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Oligonucleotídeos para avaliar o perfil de expressão dos grupos da família DRM/ARP em soja por meio de qRT-PCR.

ID (Glyma)	Nome do gene	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Glyma.03G234800, Glyma.10G151000, Glyma.19G232400 Glyma.20G237200		Fw-grupo1ARP	CACTTGTGGGACGACACCGTC
		Grupo1ARP-Rv	CTAGGTCGGAAAGTGAAGGTGTG
Glyma.07G043000, Glyma.16G011400 e Glyma.20G237200		Fw-grupo2ARP	GCACCAGGCGGTGATTTCAAG
		Grupo2ARP-Rv	TCGGCACTCTCCACTGTTGA
Glyma.13G237000 e Glyma.15G076500		Fw-grupo3ARP	AGACGTTGTTCGATGCCGTCGAC
		Grupo3ARP-Rv	TCTGAGCACCGATGGTCTTTGT
Glyma.15G076500		Fw-GmARP15g	ACACCAACAACCCCGATGAC
		GmARP15g-Rv	ACGCTCCTCCAAACGTTGTC
Glyma.02G152800	transport inhibitor response 1	Fw-GmTir1	TGTCTGGGTGTGACAACCTTAG
		GmTir1-Rv	TTGCAGCATTGGCCAAAAGG
Glyma.13G336600	Expansin-A6	Fw-GmExp	TACGTTAAGGGATCACGAACGG
		GmExp-Rv	ACAAAACGGCGTTTACTG
Glyma.10G162400	Auxin-responsive protein IAA16	Fw-GmAux/IAA	TCACCTTCATCTGCGTCTACAG
		GmAux/IAA-Rv	TGCCTTTGCAGGTGGTTTTG
Glyma.11G204200	Auxin response factor 8	Fw-GmARF	TCGGAGTTGTTGCAAAGTGC
		GmARF-Rv	ATAGCTGCTGAACCGGGATATG
Glyma.20G103200	Anthranilate synthase alpha subunit1	Fw-GmASA1	AACAAGCTGGGATGCATTGC
		GmASA1-Rv	TCAACTGCATGGCTTTGACC
Glyma.07G01740	Vegetative storage protein 2	Fw-GmVSP21	CATGGCCACAGCTACCAAATT
		GmVSP2-Rv	TTGCACGATACCTCCGGAAT
Glyma.12G02790	Cyclophilin 2	Fw-GmCYP2	CGGGACCAGTGTGCTTCTCA
		GmCYP2-Rv	CCCCTCCACTACAAAGGCTCG

Glyma.19G07240	Translation elongation factor 1-alpha	Fw-Gm ELF1A Gm ELF1A-Rv	GACCTTCTTCGTTTCTCGCA CGAACCTCTCAATCACACGC
Glyma.05G29000	Tubulin alpha-5	Fw-Gm TUA5 Gm GmTUA5-Rv	AGGTCGGAAACTCCTGCTGG AAGGTGTTGAAGGCGTCGTG
Glyma.02G44460	Translation elongation factor 1-beta	Fw-Gm ELF1B Gm GmELF1B-Rv	GTTGAAAAGCCAGGGGACA TCTTACCCCTTGAGCGTGG

4.4.4 Análise do perfil de expressão dos grupos da família DRM1/ARP em diferentes tecidos de soja e em resposta a hormônios

As plantas de soja cultivar CD 206 foram crescidas em casa de vegetação, e quando atingiram o estágio V3 na fase vegetativa foram realizadas coletas de caule, folha e raízes. Cada amostra biológica representa um *pool* de três plantas diferentes. As sementes maduras foram coletadas e pesadas, e selecionou-se 20 sementes para cada *pool* de amostras biológicas, sendo que cada semente possuía massa superior a 450mg. Após as coletas todos os materiais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C, até a extração de RNA.

As plantas de soja do cultivar CD 206 foram crescidas em casa de vegetação, e quando atingiram o estágio V3, as folhas foram coletadas higienizadas com água sanitária, álcool e água destilada. As folhas destacadas foram incubadas no escuro a 60 rpm a 25 °C, em placas de *petri* contendo meio MS (1 % sacarose, 0.5 g/L MES, 0.01 % (v/v) Tween 20, pH 5,8) suplementado com e 100µM de ácido indol-3-acético (Kim *et al.*, 2007). Foram realizadas coletas após uma, seis e doze horas do tratamento com auxina. O controle corresponde ao tempo zero horas do experimento e sem suplementação com hormônio. Cada amostra biológica representa um *pool* de folhas de três plantas diferentes. As amostras foram congeladas imediatamente após a coleta em nitrogênio líquido e armazenadas até a extração de RNA a -80 °C.

O tratamento com MeJA foi realizado por Barros (2016).

4.4.5 Análise do perfil de expressão dos grupos da família DRM1/ARP em raízes de soja suscetível inoculadas com nematóide *M. javanica*

As plantas de soja do cultivar Desafio foram cultivadas em casa de vegetação sob condições de temperatura, luminosidade e umidade controlada. As plantas aproximadamente 10 dias foram inoculadas com 20000 J2 de nematóides *M. javanica* em 5mL de água. As amostras de raízes de plantas inoculadas e não – inoculadas (MOCK) foram coletadas após 3 dias após a inoculação com nematoide. Cada amostra biológica representa material raízes de uma planta independente. As raízes foram cuidadosamente lavadas em água, e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até a extração de RNA.

4.4.6 Análise do perfil de expressão dos grupos da família DRM1/ARP em plantas de soja suscetíveis infectadas com *P. pachyrhizi*

Plantas de soja suscetíveis do cultivar EMBRAPA48 ao fungo *P. pachyrhizi* foram cultivadas em casa de vegetação sob condições de temperatura, luminosidade e umidade controlada, nas instalações da Embrapa Soja, Londrina-PR. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com três replicatas biológicas, e cada uma contendo três plantas. Após atingir o estágio V2, foram inoculadas, através da pulverização com uma suspensão contendo 3×10^5 esporos/mL do fungo *P. pachyrhizi*. Para controle do experimento, plantas no mesmo estágio foram falsamente inoculadas (MOCK). As coletas foram realizadas em 12, 24, 48, 192 horas após a inoculação de folhas de plantas controle e infectadas. O material foi imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada a -80°C (Alves *et al.*, 2015).

4.4.7 Análises do perfil de expressão de genes relacionados auxina em plantas de soja infectadas com fungo *P. pachyrhizi*

Avaliou-se o perfil de expressão dos genes relacionados com metabolismo de auxina em plantas infectadas com fungo causador da FAS. Os genes estão descritos na tabela (Tabela 5). Os genes relacionados a auxina já descritos na literatura como responsivos a patógenos foram selecionados para identificação de homólogos em soja. As sequências de aminoácidos desses genes foram utilizadas para buscas utilizando BLASTP no banco de dados Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Os CDS desses genes foram utilizados para desenho dos oligonucleotídeos no programa primer3 plus (Untergasser *et al.*, 2007).

4.4.8 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR e análises estatísticas

A extração do RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. O tratamento com DNase e o qRT-PCR foi realizado como descrito no como item 4.2.3 do Material e Métodos.

A expressão dos grupos DRM1/ARPs em resposta aos hormônios IAA e JA, em plantas de soja infectadas pelo fungo, e em tecidos de soja foram normalizadas em relação a expressão dos genes endógenos *GmUBC4*, *GmELF1A* e *GmCYP2*. Para determinar a

diferença de expressão entre os tecidos, utilizou-se ANOVA *One-way analysis of variance* com *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Para avaliar o efeito dos tratamentos com os hormônios, utilizou-se ANOVA *One-way analysis of variance* com *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Para verificar o efeito da infecção com o fungo *P. pachyrhizi*, e o nematóide *M. javanica*, utilizou-se ANOVA *One-way analysis of variance* *Bonferroni's Multiple Comparison Test* e teste T, respectivamente. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc.).

4.5 Silenciamento dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g*

4.5.1 Construção de plasmídeo de VIGS

As sequências parciais de 272 pb (posição 962-1233pb) e 288 pb (posição 12-299 pb) dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g*, respectivamente, foram amplificadas por PCR utilizando cDNA de folhas de soja CD 206 e os oligonucleotídeos específicos com sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *BamHI* (Tabela 6). Os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o kit *PureLink™ PCR Purification* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

O vetor viral pBPMV IA-1033, especificamente o RNA2 (Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010), e os fragmentos de PCR foram previamente digeridos com enzimas de restrição *XhoI* (Promega) e *BamHI* (Promega) por 3h a 37 °C seguido por uma purificação com o kit *Qiagen QIAquick PCR Purification* (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. Por fim, as amostras foram quantificadas com o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

A reação de ligação do inserto no vetor foi realizada para um volume final de 10µL, utilizando aproximadamente 30 ng do DNA clivado, 100 ng do vetor clivado, tampão de reação e 1U de T4 DNA Ligase (Promega). A reação foi incubada a 4°C por aproximadamente 16 horas. Em seguida, a enzima foi inativada 65°C por 5 min.

A presença dos fragmentos no vetor foi confirmada por PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos de cada gene. A reação de ligação foi utilizada para transformação bacteriana via choque térmico da cepa DH5α. O plaqueamento das células transformadas foi realizado em meio TB contendo ampicilina 50µg/mL e as placas mantidas a 37 °C até o aparecimento de colônias isoladas. Os transformantes foram

confirmados por PCR de colônia utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene (tabela 5). Os clones positivos foram utilizados para extração do DNA plasmidial utilizando o kit *QIAprep® Miniprep* (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante.

4.5.2 Produção de inóculo viral

O vetor viral BPMV IA-1033 (RNA1 e RNA2) e SMV, utilizado para propiciar maior acúmulo de BPMV nos tecidos, foram usados para bombardear plantas unifolioladas do cultivar Williams 82 com aproximadamente 14 dias utilizando o bombardeador de micropartículas (Gene gun) do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja. O vetor vazio BPMV IA-1033 foi utilizado como controle negativo.

Primeiramente, partículas de ouro foram lavadas com etanol 100%, em seguida, resuspendidas em água e armazenadas a -20°C até o momento do uso. Utilizou-se 3µg do alvo juntamente com 2 µg de RNA1 e 0,5µg de SMV. Esses três componentes foram pipetados em um único tubo alocado em um sonicador e foi adicionado uma mistura de glicerol 50%, CaCl₂ 2,5M e espermidina 0.1 M. As suspensões contendo as micropartículas de ouro foram lavadas com isopropanol e aplicadas no centro da membrana macrocarreadora. Após o bombardeamento, as plantas foram borrifadas com água destilada e mantidas por 2 dias em câmara de crescimento a 22 °C, devidamente cobertas com saco plástico a fim de manter a umidade. Posteriormente, as plantas transformadas foram transferidas para vasos e mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada a 23 °C. Aproximadamente três semanas após o bombardeamento observou-se os sintomas de enrugamento das folhas características da infecção viral.

As folhas que apresentaram sintomas foram coletadas, identificadas e liofilizadas no liofilizador Liotop L101 por cerca de 24 horas. Em seguida, as folhas liofilizadas foram colocadas em tubos *Falcon* de 50 mL, contendo sílica gel, e armazenadas em freezer a -20°C até o momento da inoculação (*Rub-inoculation*).

4.5.3 Experimento VIGS

Plantas do mesmo genótipo usado para produção de inóculo foram utilizadas no experimento de VIGS. O experimento foi conduzido em câmara climatizada (*Fitotron*) com temperatura controlada (22 °C durante o dia e 20 °C durante a noite), fotoperíodo de 16 h de luz e aproximadamente 50 % de umidade relativa do ar.

Foram semeadas cinco sementes por vaso. Após a germinação, foram desbastadas duas plantas, restando três plantas por vaso. Foram utilizadas três repetições em um delineamento inteiramente casualizado. Duas semanas após a semeadura, quando as plantas estavam unifolioladas, foi realizada a inoculação mecânica (*Rub-inoculation*). Foram preparadas as soluções partindo de cerca de 100mg de folhas liofilizadas para 5mL de tampão fosfato K₂PO₄ 50 mM, pH 7,0. As folhas liofilizadas com as respectivas construções foram maceradas com o auxílio de um gral de porcelana e pistilo (previamente gelados) juntamente com o tampão fosfato. Todas as plantas foram previamente pulverizadas com Carborundum (carbureto de silício), em seguida foi aplicada a solução (construção ou vetor vazio e tampão fosfato) nas duas folhas unifoliadas friccionando levemente com os dedos para ajudar a penetração da construção nas células. Por fim, as plantas foram borrifadas com água destilada e os vasos cobertos com plástico para manter a umidade por dois dias. Após a retiradas destes, as plantas foram borrifadas diariamente com água destilada para favorecer o aparecimento de sintomas. Aproximadamente três semanas após a inoculação viral, os sintomas começaram a aparecer.

Após o aparecimento dos sintomas, cerca de 21 dias após a inoculação viral, fez-se a inoculação com 10⁵ esporos.mL⁻¹ de *P.pachyrhizi*. Para confirmar o silenciamento do gene *GmARP15g* foi coletado material após 24 horas e para o silenciamento do gene *GmbZIP105* em 48h após a inoculação. Uma folha do terceiro trifólio foi coletada para confirmação do silenciamento por qRT-PCR e as outras duas folhas do mesmo trifólio foram mantidas para posterior avaliação fenotípica, que foi efetuada 14 dias após a inoculação

As folhas para utilizadas em ensaios de qRT-PCR foram embaladas em papel alumínio identificadas, e imediatamente congeladas e armazenadas -80 °C para posterior extração de RNA. As folhas coletadas para avaliação fenotípica foram armazenadas em placas de *petri* também a -80 °C até o momento da avaliação.

4.5.4 Avaliação fenotípica

As plantas foram avaliadas fenotipicamente 14 dias após a inoculação da ferrugem de acordo com parâmetros descritos por Yamanaka *et al.* (2010): nível de esporulação, número de urédias/lesão, número de urédias abertas, frequência por cm² e severidade.

A severidade foi determinada pela porcentagem de lesões utilizando fotos das

folhas coletadas. As imagens foram processadas nos softwares Photoshop cs6 and ImageJ. Os dados fenotípicos de todos os parâmetros foram avaliados em 18 folhas, totalizando 180 lesões avaliadas por tratamento. As plantas inoculadas somente com a construção contendo o vetor vazio foi utilizada como controle nos testes estatísticos.

4.5.5 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), com modificações. As amostras foram trituradas em gral de porcelana com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Aproximadamente 100 mg de tecido foi transferido para tubo de 1,5 mL *RNAse-free* previamente resfriado. Ao material foi adicionado 1 mL de Trizol gelado, e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo *RNAse-free*, e adicionou-se 400 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e incubou por 5 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo *RNAse-free*, e adicionou-se 250µL de *light salt* (0,8 M de citrato e 1,2 M de NaCl). O conteúdo foi agitado e incubado por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 75%. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi dissolvido em 20µL de água ultrapura. Os RNAs foram estocados em -80 °C.

Para verificar a integridade do RNA, aplicou-se 1µL de RNA em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo. A quantificação foi realizada em *Qubit Fluorometer* utilizando o kit *Qubit RNA BR Assay* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

4.5.6 Confirmação do silenciamento gênico por ensaios de qRT-PCR

O qRT-PCR foi realizado como descrito no item 4.2.3. Para os ensaios de qRT-PCR foram utilizadas três réplicas biológicas (cada amostra consiste em três plantas diferentes) e duas réplicas técnicas. Entretanto, nesse caso, partiu-se de 1,5µg de RNA total para síntese do cDNA, e utilizou para as reações de qRT-PCR 1µL de cDNA não diluído. Realizou-se uma curva padrão com diluições de cDNA para os oligonucleotídeos de GmbZIP105-VIGS, GmARP15g, GmPR1, GmPR2 e GmTGA e GmCYP2, que foi

utilizada para calcular os valores de quantificação relativa de cada amostra para cada gene (tabela 4, e 6). A expressão do gene *GmCYP2* foi utilizado para normalizar os dados de qRT-PCR. Para determinar a diferença de expressão dos genes entre o controle e o tratamento, utilizou-se o teste t. Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc.).

Tabela 6. Oligonucleotídeos específicos para clonagem parcial dos genes GmbZIP105 e GmARP no vetor pBPMV-1033 e para a confirmação do VIGS por qRT-PCR.

Nome do gene	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
Glyma.03G247100	Fw-GmbZIP105-VIGS	ATATCTCGAGTGTTCATCACTGGGAATGC
	GmbZIP105-VIGS-RV	AAATGGATCCAGTTCCACGTGAATCTGC
	Fw-GmbZIP105-VIGS-RT	GGATTCCTTCCTCACCTTCCA
	GmbZIP105-VIGS-RT	TGTTCTCCTGATGATCCACTTATTG
Glyma.15G076500	Fw-GmARP15g-VIGS	ATATCTCGAGAGAGAAGCTCTGGGATGATG
	GmARP15g-VIGS-RV	AAATGGATCCGTGTTGGGAAGTGGTTTGTC
	Fw-GmARP15-VIGS-RT	ACACCAACAACCCCGATGAC
	GmARP15-VIGS-RT-RV	CATGGGGAAAAGAACGTAGCAAC
Glyma.15G06780	Fw-GmPR1	AACTATGCTCCCCGGCAACTATATTG
	GmPR1-Rv	TCTGAAGTGGCTTTACATCGAAACAA
Glyma .03G132700	Fw-GmPR2	TTCGGTTGATGCTGTTTATGCT
	GmPR2-Rv	PR2 GCCATCCACTCTCAGACACAAC
Glyma .20G246400	Fw-GmTGA	GCTAGGCAGCATGGGATTTTC
	GmTGA2-Rv	TGA2 TCAAATTGCATTGCCCCATT

4.6 Técnicas de Biologia Molecular

Todas as técnicas de Biologia Molecular que não estão expostas detalhadamente no tópico de Material e Métodos, como preparação de géis de agarose, extração de plasmídeos, preparo de células competentes, transformação de bactérias, extração de DNA genômico, reações de PCR, preparação de soluções estoques, foram conduzidas segundo protocolos contidos em Sambrook *et al.*, (1989).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem para obtenção de genes alvos do fator de transcrição GmbZIP105

5.1.1 Validação da superexpressão do gene *GmbZIP105* em protoplastos de soja por qRT-PCR

A superexpressão do gene *GmbZIP105* foi confirmada por meio de quantificação relativa por curva padrão, utilizando o gene *GmUBC4* para normalização dos dados (Figura 2). A superexpressão transiente em protoplastos de soja, se mostra uma técnica eficiente e rápida para estudo das funções de genes em soja, visto que a transformação estável é mais complexa e trabalhosa.

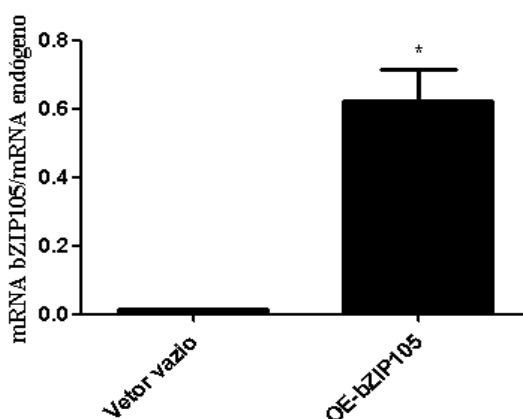


Figura 2: Validação da superexpressão de *GmbZIP105* (OE-*GmbZIP105*) em protoplastos de soja. O valor de quantificação relativa foi calculado baseado na curva padrão de cada oligonucleotídeos, e normalizado utilizando o gene *GmUBC4* como gene endógeno. Assim os valores referentes ao mRNA de *GmbZIP105* foi dividido pelos valores de mRNA do endógeno *GmUBC4*. As médias indicadas por um asterisco diferiram estatisticamente do tratamento controle (vetor vazio) pelo teste t $P < 0,05$.

5.1.2 O fator de transcrição GmbZIP105 regula a expressão de genes relacionados com a fotossíntese

Serão apresentados dados do controle.2 e do bZIP105.2 (Figuras suplementares 1, 2 e 3), porque a qualidade da montagem dos transcritos das bibliotecas controle.1 e

bZIP105.1, não foram apropriados para as análises seguintes. Os dados PE trimados foram utilizados para o mapeamento das *reads* no genoma da soja. Das *reads* PE 32,1% (17265856) e 34,1% (26189404), do controle.2 e do bZIP105.2 respectivamente, mapearam no genoma da soja. As *reads* que não mapearam no genoma da soja, referem-se principalmente *Pseudomonas putida* e *Pantoea ananatis*, bactérias normalmente associadas a cultura de soja. As folhas de soja utilizadas para preparo dos protoplastos são oriundas de casa de vegetação, portanto uma condição de cultivo não estéril. Provavelmente a desinfestação utilizada não foi eficiente. Desta forma as bactérias que estavam presentes nas folhas, se mantiveram nos protoplastos, e se proliferaram no meio MS com sacarose.

Nas tabelas 8 e 9 estão representados os 20 genes com menor valor de *fold change* (*down* regulados) e maior *fold change* (*up*-regulados). Os genes foram identificados a partir de BLAST nos bancos NCBI (Benson *et al.*, 2014) e Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). Os genes estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como, tradução, sinalização celular, respiração, regulação da expressão gênica e fotossíntese (Tabelas 8 e 9). Observou-se um número considerável de genes relacionados com a fotossíntese. Por isso, selecionou-se 5 genes relacionados com a fotossíntese e um fator de transcrição, para validação dos alvos do fator de transcrição GmbZIP105 (Tabela 7).

Tabela 7. Genes selecionados para validação da triagem dos alvos do fator de transcrição GmbZIP105 por qRT-pCR.

Alvo	Eficiência	Concentração (μ M)
Glyma.06G224200	1	2,5
Glyma.13G056000	0,97	2,5
Glyma.05G128000	1	2,5
Glyma.04G050400	0,83	2,5
Glyma.01G180800	1	2,5
Glyma.04G020300	1	2,5

Os oligonucleotídeos foram testados em DNA genômico, e apresentou uma única banda. Além disso, pode-se observar um pico único na curva de *melting* no qRT-PCR, indicado que os oligonucleotídeos são específicos. A eficiência da reação com os oligonucleotídeos foi satisfatório (0,83- 1) (Tabela 7). As reações de qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes relacionados com a fotossíntese em protoplastos

Tabela 8: Genes down-regulados no transcriptoma de protoplastos superexpressando GmbZIP105. Identificação dos genes no banco de dados Phytozome dado por Glyma. *Fold change* representa a razão entre o FPKM da amostra supexpressando *GmbZIP105* pelo controle. Processos fisiológicos que esses genes estão envolvidos.

ID (Glyma)	Log2 do Fold change	Nome do gene	Processo fisiológico	Referência
Glyma.13G166400	-33	<i>Large Subunit Ribosomal Protein L36 (RP-L36, MRPL36, rpmJ)</i>	Tradução	Graifer e Karpova., 2015 Tao <i>et al.</i> , 2018
	-33	<i>trnS-UGA</i>	Tadução	
Glyma.15G262700	-33	<i>Psbt (Photosystem Ii Protein T) Pthr36411:Sf2 - Photosystem Ii Reaction Center Protein</i>	Fotossíntese	Wei <i>et al.</i> , 2016
Glyma.20G150600	-33	<i>Early Light-Induced Protein 1, Chloroplastic-Related (ELIP1))</i>	Fotossíntese	Yamagata e Bowler, 1997
Glyma.09G164100	-33	<i>putative GEM-like protein 8</i>		
Glyma.13G165200	-33	<i>Small Subunit Ribosomal Protein S11e (RP-S11e, RPS11)</i>	Tradução	Graifer e Karpova., 2015 Tao <i>et al.</i> , 2017 Tao <i>et al.</i> , 2017
	-32	<i>trnH-GUG</i>	Tradução	
	-32	<i>trnD-GUC</i>	Tradução	
Glyma.11G154900	-32	<i>PRP3 (repetitive proline-rich cell wall protein 3)</i>	Composição de parede celular	Hong <i>et al.</i> , 1990
Glyma.13G350200	-32	<i>Uncharacterized Protein</i>		
Glyma.18G078500	-32	<i>Small Subunit Ribosomal Protein S19 (RP-S19, Rpss)</i>	Tradução	Graifer e Karpova., 2015 Tao <i>et al.</i> , 2017 Tao <i>et al.</i> , 2017
	-32	<i>trnE-UUC</i>	Tradução	
	-32	<i>trnM-CAU</i>	Tradução	
Glyma.13G068600	-32	<i>NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3 (ndhC)</i>	Respiração celular	Marreiros <i>et al.</i> , 2016

	-32	<i>trnfM-CAU</i>	Tradução	Tao <i>et al.</i> , 2017
Glyma.05G053600	-32	<i>ATP-Dependent Clp Protease Proteolytic Subunit-Related Protein 2, Chloroplastic</i>		
Glyma.08G042700	-32	<i>Uncharacterized protein</i>		
Glyma.15G251500	-32	<i>Glutathione S-Transferase U21-Related</i>		
	-31	<i>trnQ-UUG</i>	Tradução	Tao <i>et al.</i> , 2017
Glyma.14G179200	-31	<i>serine carboxypeptidase-like 45</i>		
Glyma.09G111600	-31	<i>Large Subunit Ribosomal Protein L16 (RP-L16, MRPL16, Rplp)</i>		Graifer e Karpova., 2015
Glyma.15G177800	-31	<i>Cathepsin H (CTSH)</i>		
Glyma.12G232200	-31	<i>Small Subunit Ribosomal Protein S18</i>		Graifer e Karpova., 2015

Tabela 9: Genes *up*-regulados no transcriptoma de protoplastos superexpressando *GmbZIP105*. Identificação dos genes no banco de dados Phytozome (Glyma). *Fold change* representa a razão entre o FPKM da amostra supexpressando *GmbZIP105* pelo controle. Processos fisiológicos que esses genes estão envolvidos.

ID (Glyma)	Log2 do Fold change	Nome do gene	Processo fisiológico	Referência
Glyma.14G132400	31,71126	<i>uncharacterized LOC100527128 (GGL domain (G-gamma))</i>	Sinalização celular	
Glyma.15G187600	31,68355	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (ND5)</i>	Respiração celular	Wirth <i>et al.</i> , 2016
Glyma.16G103900	31,63457	<i>isoflavone reductase (IFR)</i>	Metabolismo secundário	Cheng <i>et al.</i> , 2015
Glyma.13G301400	31,62781	<i>Wound-induced protein</i>	Resposta a estresse biótico	Li <i>et al.</i> , 2013
Glyma.02G067400	31,36424	<i>Small subunit ribosomal protein S27e (RPS27)</i>	Manutenção da estrutura do ribossomo	Wang <i>et al.</i> , 2015
Glyma.11G081000	31,34594	<i>Uncharacterized protein</i>		
Glyma.12G174600	31,26653	<i>Uncharacterized protein</i>		
Glyma.12G086600	31,15863	<i>Cytochrome c oxidase subunit VIIa (COX7a)</i>	Respiração celular	Kadenbach e Hüttemann., 2015
Glyma.05G128000	31,14345	<i>light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1 (LHCBI)</i>	Fotossíntese	Nosek <i>et al.</i> , 2017
Glyma.13G056000	31,04482	<i>Transcription Factor TCP13</i>	Regulação da expressão gênica	Zhou <i>et al.</i> , 2017
Glyma.02G116900	31,04271	<i>Dehydrogenase/Reductase SDR family member 4 (DHRS4)</i>		
Glyma.04G050400	31,01131	<i>Ferrochelatase-1, Chloroplastic/Mitochondrial</i>	Biossíntese de grupo heme	Hey <i>et al.</i> , 2016
Glyma.06G321900	31,00329	<i>Photosystem I Subunit V (psaG)</i>	Fotossíntese	Suga <i>et al.</i> , 2016
Glyma.06G321900	31,00329	<i>Photosystem I Subunit V (psaG)</i>	Fotossíntese	Suga <i>et al.</i> , 2016

Glyma.13G345600	30,97914	<i>60s Ribosomal Protein L38</i>	Tradução	Kuwano et al., 1991
Glyma.03G247100	30,94365	<i>bZIP105- CAMP-response element binding protein-related</i>	Regulação da expressão gênica	Alves <i>et al.</i> , 2015
Glyma.10G291500	30,93542	<i>Large Subunit Ribosomal Protein L35e (RP-L35e, RPL35)</i>	Tradução	Graifer e Karpova, 2015
Glyma.01G180800	30,90876	<i>Photosystem II Oxygen-Evolving Enhancer Protein 1 (psbO)</i>	Fotossíntese	Wei <i>et al.</i> , 2016
Glyma.17G000100	30,90848	<i>Ribonucleases P/Mrp Protein Subunit Pop1 // Subfamily Not Named</i>	Tradução	Hartmann1 e Hartmann, 2003
Glyma.06G224200	30,85037	<i>thylakoid lumenal 16.5 kDa protein, chloroplastic</i>		
Glyma.04G020300	30,83116	<i>plastocyanin (petE)</i>	Fotossíntese	Zhou <i>et al.</i> , 2018

superexpressando o gene *GmbZIP105* serão realizadas futuramente.

Os genes relacionados com a fotossíntese, *Thylakoid luminal 16,5Kda*, *Lhcb1*, *Ferredoxin-2*, *PetE*, *PsbO*, *ELIP1*, *PsaG*, *PsbT*, *ELIP1*, foram *up/down* regulados na triagem para identificação dos possíveis alvos do fator de transcrição *GmbZIP105* (tabelas 8 e 9). Entre os genes *up*-regulados, estão *Lhcb1* e *PSBO*, ambos os genes codificam proteínas que compõem o complexo do PSII. PSII é um dos principais complexos envolvidos na fotossíntese. Ele está localizado nas membranas dos tilacoídes. PSII é um macro complexo proteico formado por um núcleo dimérico e o complexo coletor de luz (LHCII). O gene *Lhcb1* codifica uma das proteínas do LHCII (Sugihara *et al.*, 2000; Pietrzykowska *et al.*, 2014; Nelson e Cox, 2014). Enquanto, o gene *PSBO* codifica uma das enzimas do complexo de liberação do oxigênio, onde ocorre a quebra da molécula de água e transferência dos elétrons um de cada vez para o P680 (PSII) (Rivas e Barber, 2004; Nelson e Cox, 2014).

Várias funções são atribuídas aos fatores de transcrição bZIP em diferentes espécies, a regulação da fotossíntese é uma delas. A regulação da fotossíntese por fatores de transcrição da família bZIP foi relatada em soja e arábida. Em soja, os fatores de transcrição *GmbZIP04g* e *GmbZIP07g* se ligam ao promotor do gene da *rubisco ativase* (*GmRCAa*), promovendo a ativação da transcrição (Zhang *et al.*, 2016). Em arábida, o fator de transcrição bZIP, *AtHY5*, se liga ao *cis*- elementos G-box do promotor do gene *Phytoene Synthase (PSY)*, e desta forma promove a acumulação dos fotopigmentos carotenoides e clorofila (Toledo-Ortiz *et al.*, 2014). Aqui relatamos pela primeira vez a regulação de vários genes relacionados a fotossíntese pelo fator de transcrição *GmbZIP105*. Atribuindo a essa proteína mais de uma função, visto que recentemente *GmbZIP105* foi relatado como responsivo a patógeno e ao tratamento com os hormônios SA e JA, sugerindo uma possível função em vias de defesa a patógeno (Alves *et al.*, 2015).

5.2 GmARP15g codificada pelo gene Glyma.15G076500, que interage com o fator de transcrição GmbZIP105, é membro de uma família de proteínas com domínio *dormancy/auxin associated protein*

A levedura expressando a construção pBD-*GmbZIP105* + pAD-*GmARP15g* cresceu em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano, histidina e no mesmo meio seletivo acrescido com até 12,5 mM de 3AT (Figura 3). Entretanto, a levedura com

as construções inversas, pBD-GmARP15g +pAD-GmbZIP105, cresceu apenas em meio deficiente em leucina e triptofano (dados não apresentados). A ausência de crescimento do clone contendo a construção pBD-GmARP15g +pAD-GmbZIP105 neste meio seletivo, pode ter ocorrido devido a problemas com o vetor pDEST22. Vários testes foram realizados utilizando este vetor, que gerou resultados controversos. Então, para os outros ensaios de duplo híbrido, optou-se por substituir este vetor pelo pEXPAD-502, que produz o mesmo tipo de fusão: AD+ gene de interesse. Os controles negativos pBD + pAD, pBD+pAD-*GmARP15g*, pBD-ARP15g+ pAD, pBD-GmbZIP105+pAD cresceram apenas em meio deficiente em leucina e triptofano, evidenciando assim a presença de ambos os vetores que possibilita o crescimento nesse meio (Figura 3). A ausência de crescimento da levedura com os vetores pBD-GmbZIP105+pAD em meio sem histidina, indica que este fator de transcrição não é capaz de ativar sozinho a expressão do gene *HIS*.

GmbZIP105 é um gene que codifica uma proteína de 414 resíduos de aminoácidos, com localização nuclear (Alves, 2013). Esse fator de transcrição não é capaz de ativar sozinho a expressão do gene repórter *HIS* em levedura (Alves *et al.*, 2015). A triagem de uma biblioteca de cDNA utilizando a proteína GmbZIP105 como isca, resultou em três possíveis parceiros de interação, entre eles, GmARP15g (Souza, 2014). Neste trabalho, realizou-se vários ensaios de duplo híbrido em leveduras para confirmar essa interação.

A proteína GmARP15g é codificada pelo *locus* gênico Glyma.15G076500. Este gene pertence à família *DRM1/ARP*. Os primeiros genes desta família foram descritos em ervilha, *PsDRM1* e *PsDRM2*, e estes foram associados com manutenção da dormência em gemas axilares (Stafstrom *et al.*, 1998). Posteriormente, outros membros da família *DRM1/ARP* foram relacionados com repressão do crescimento e resposta a patógeno (Lee *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014).

GmARP15g é uma proteína de função desconhecida, possui 120 resíduos de aminoácidos, e massa molecular de 12,4 kDa. Não possui peptídeo sinal, assim provavelmente é uma proteína citoplasmática. Como confirmado pela localização citoplasmática das proteínas de *B.rapa* BrARP1 e BrDRM1, em protoplastos de *A.thaliana* (Lee *et al.*, 2013).

Ainda não foram relatadas interações entre as proteínas da família DRM1/ARP com outras proteínas. Portanto, a interação entre GmbZIP105 e GmARP15g é a primeira descrita. Desta forma, é atribuída pela primeira vez uma função bioquímica para esta

família de proteína. Considerando que fatores de transcrição são regulados por outras proteínas, esta interação com GmARP15g, pode modular a localização ou a função de GmbZIP105.

A interação proteína-proteína mais bem elucidada envolvendo fatores de transcrição bZIPs, ocorre entre membros da subfamília TGA e NPR1. Em *A. thaliana*, sob estímulo da sinalização de SA, a proteína NPR1 é translocada para o núcleo onde interage com o fator de transcrição TGA. Após a interação, TGA se liga à *cis*-elementos no promotor de genes responsivo a SA (Zhou *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Spoel *et al.*, 2009). Outro exemplo de interação é a proteína LSD1 que interage com o fator de transcrição AtbZIP10, retendo-o parcialmente no citoplasma, retardando sua atividade transcricional (Kaminaka *et al.*, 2010).

Análises mais detalhadas das sequências de aminoácidos de Ade-DRM1, AtDRM1 e AtDRM2, sugerem que essas proteínas tenham uma estrutura intrinsecamente desorganizadas. Além disso, possuem vários sítios de interação proteína-proteína na porção central da cadeia de aminoácidos (Wood *et al.*, 2013; Rae *et al.*, 2014). Acredita-se que estrutura desorganizada é importante para o reconhecimento molecular, porque se liga com alta especificidade e baixa afinidade, além de serem capazes de se ligar a diferentes parceiros de forma diferente, ajustando-se a cada interação (Chen *et al.*, 2006).

Devido a características intrínsecas das sequências das proteínas DRM1/ARP, caracterizadas em *arabidopsis* e *kiwi*, elas podem ser importantes componentes em vias de sinalização. As proteínas codificadas pelos genes *GmARP15g* e *AtDRM1*, possuem certa similaridade de sequência. Assim provavelmente, devido à similaridade de sequência a nível de aminoácido entre estas proteínas, GmARP15g pode apresentar regiões intrinsecamente desorganizada, e estas favorecem a sua interação com o fator de transcrição GmbZIP105, podendo ter até mesmo outros parceiros de interação.

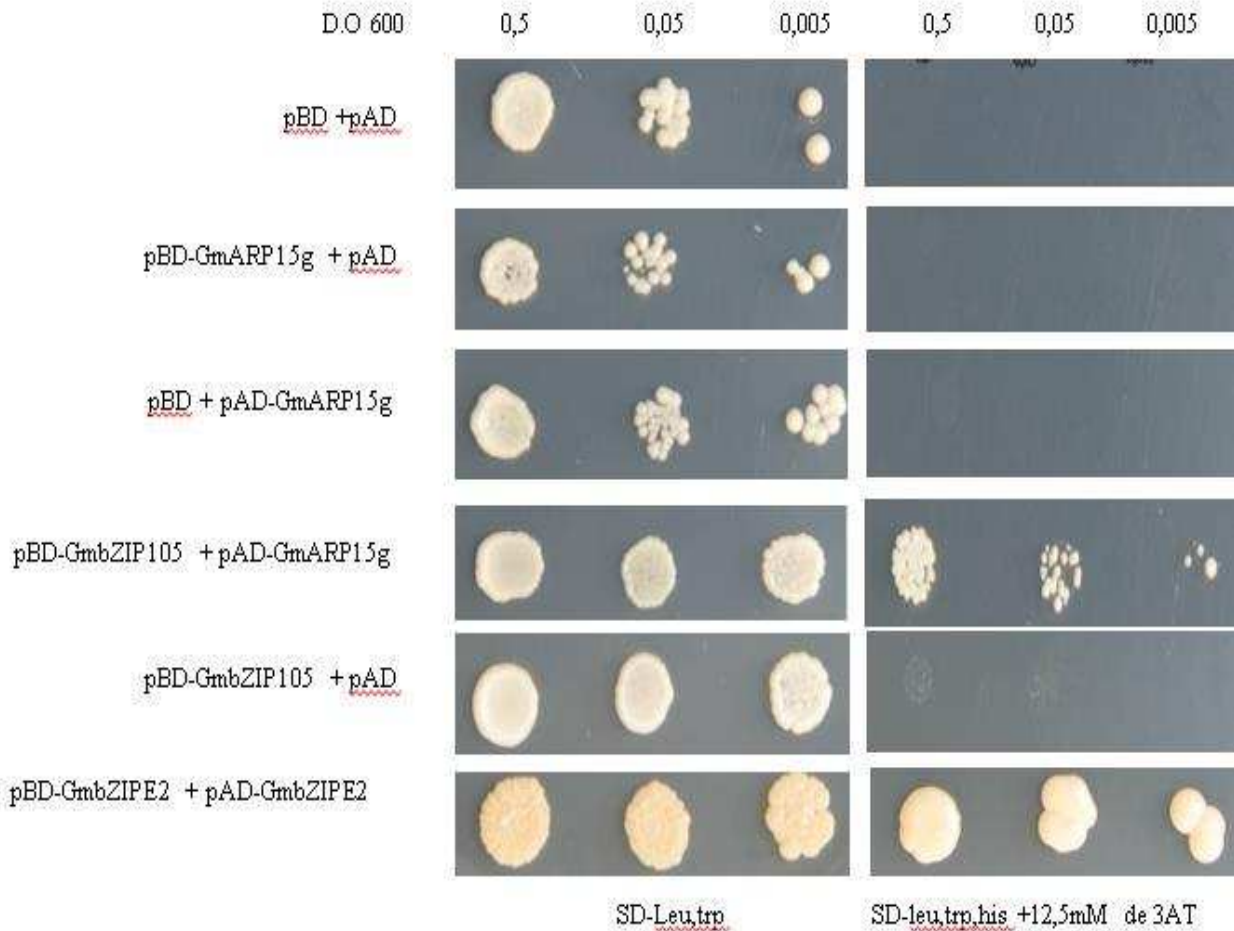


Figura 3: GmbZIP105 interage com GmARP15g no sistema de duplo híbrido de leveduras. Crescimento das colônias em meios sólido seletivos SD-Leu-Trp e Sd-Leu-Trp-His com 12,5 mM de 3-AT, após três e sete dias de incubação a 30 °C, respectivamente. O ensaio foi realizado com os clones: pBD-vazio + pAD-vazio, pBD-GmARP15g + pAD-vazio, pBD- vazio + pAD-GmARP15g, pBD-GmbZIP105 + pAD-GmARP15g, pBD-GmbZIP105 + pAD e pBD-GmbZIPE2+ pAD-GmbZIPE2 com as gotas referentes a DO 0,5, 0,05 e 0,005. Como controle positivo foi utilizado a proteína GmbZIPE2, que é capaz de formar homodímeros (Alves, 2015).

5.3 Análise *in-silico* e perfil de expressão dos genes *DRM1/ARP* em soja

5.3.1 Identificação e nomenclatura da família gênica *DRM/ARP* em quatro leguminosas

A sequência de aminoácidos de AT1G28330.5 foi utilizada para obter os outros representantes da família *DRM1/ARP* em *A.thaliana*. Todas as 13 sequências resultantes de *A. thaliana*, foram utilizadas separadamente na nova triagem para identificação dos membros da família *DRM1/ARP* em quatro leguminosas e em *B.rapa*. As sequências de proteínas candidatas com *e-value* $\leq 1^{-10}$ superior foram selecionadas, e a presença do domínio *dormancy/auxin associated protein* (PF05564) foi confirmado no banco de dados PFAM (Finn *et al.*, 2014). Os candidatos que não possuíam esse domínio íntegro ou com *e-value* $\leq 1^{-5}$ superior foram descartados.

Através de similaridade de sequências e pesquisa de domínio, identificou-se 27 sequências de proteínas em Gm, 12 em Mt, 8 em Pv, 5 em Tp, 11 em Br e 13 em At. A família *DRM1/ARP* de soja é a maior, com 27 proteínas, que são codificadas por 8 genes, localizados em 8 cromossomos diferentes (nos cromossomos 3, 7, 10, 13, 15, 16, 19 e 20). Aparentemente essa família gênica possui poucos membros, sendo que arábido possui 5 genes e Kiwi (*A. deliciosa*) 8 (Wood *et al.*, 2013; Rae *et al.*, 2014).

As proteínas preditas de soja possuem de 106 a 211 aminoácidos de tamanho, com massa molecular de 11,59 (Glyma.13G237000.3) a 22,51kDa (Glyma.19G232400.3). Geralmente, são proteínas pequenas com menos de 20 KDa (Wood *et al.*, 2013). Todas possuem ponto isoelétrico teórico elevado, variando de 8,89 (Glyma.13G237000.2) a 10,26 (Glyma.20G237200.3). As proteínas já caracterizadas não possuem peptídeo sinal ou marcação para organelas, sugerindo uma localização citoplasmática, como verificado para as proteínas BrARP1 e BrDRM1 de *B. rapa* (Lee *et al.*, 2013). As informações mais detalhadas sobre esses genes nas quatro espécies de leguminosas, *B. rapa* e *A.thaliana* estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. Lista de genes DRM1/ARP em leguminosas, *A. thaliana* e *B.rapa*. Os genes e as proteínas codificadas por eles, as informações do tamanho das regiões codificadoras (CDS) e das proteínas em resíduos de aminoácidos (Ptn aa), ponto isoelétrico (PI), massa molecular em kDA (Mw kDA), e os grupos que as proteínas pertencem definidos pelo método de K-means.

ID	Gene	Proteína	CDS pb)	Ptn aa	PI	Mw (kDA)	Grupo
Gm1	Glyma.13G237000	Glyma.13G237000.1	354	117	9,75	12,94	3
Gm2	Glyma.13G237000	Glyma.13G237000.3	321	106	9,40	11,59	3
Gm3	Glyma.13G237000	Glyma.13G237000.4	348	115	10,22	12,69	3
Gm4	Glyma.13G237000	Glyma.13G237000.2	345	114	8,89	12,44	3
Gm5	Glyma.15G076500	Glyma.15G076500.1	363	120	8,95	13,31	3
Gm6	Glyma.03G234800	Glyma.03G234800.1	375	124	9,69	13,34	1
Gm7	Glyma.10G151000	Glyma.10G151000.3	381	126	9,51	13,49	1
Gm8	Glyma.10G151000	Glyma.10G151000.4	378	125	9,76	13,33	1
Gm9	Glyma.10G151000	Glyma.10G151000.2	384	127	9,51	13,54	1
Gm10	Glyma.10G151000	Glyma.10G151000.1	396	131	8,89	14,01	1
Gm11	Glyma.19G232400	Glyma.19G232400.3	624	207	9,54	22,51	1
Gm12	Glyma.19G232400	Glyma.19G232400.2	465	154	9,95	17,05	1
Gm13	Glyma.19G232400	Glyma.19G232400.6	462	153	9,50	16,91	1
Gm14	Glyma.19G232400	Glyma.19G232400.5	570	189	9,18	20,45	1
Gm15	Glyma.19G232400	Glyma.19G232400.4	570	189	9,18	20,45	1
Gm16	Glyma.19G232400	Glyma.19G232400.1	636	211	9,14	23,23	1

Gm17	Glyma.20G237200	Glyma.20G237200.2	381	126	10,07	13,47	1
Gm18	Glyma.20G237200	Glyma.20G237200.3	375	124	10,26	13,24	1
Gm19	Glyma.20G237200	Glyma.20G237200.1	414	137	9,56	14,44	1
Gm20	Glyma.20G237200	Glyma.20G237200.4	393	130	9,51	13,95	1
Gm21	Glyma.07G043000	Glyma.07G043000.3	324	107	10,62	11,45	2
Gm22	Glyma.07G043000	Glyma.07G043000.1	381	126	9,69	13,95	2
Gm23	Glyma.07G043000	Glyma.07G043000.2	369	122	9,80	13,14	2
Gm24	Glyma.16G011400	Glyma.16G011400.1	327	108	10,10	11,32	2
Gm25	Glyma.16G011400	Glyma.16G011400.4	327	108	10,10	11,32	2
Gm26	Glyma.16G011400	Glyma.16G011400.2	327	108	10,10	11,32	2
Gm27	Glyma.16G011400	Glyma.16G011400.3	327	108	10,10	11,32	2
Pv1	Phvul.006G183600	Phvul.006G183600.2	351	116	9,63	12,75	3
Pv2	Phvul.006G183600	Phvul.006G183600.1	468	155	9,27	17,40	3
Pv3	Phvul.010G126600	Phvul.010G126600.2	333	110	9,77	13,45	2
Pv4	Phvul.010G126600	Phvul.010G126600.3	276	91	10,57	11,69	2
Pv5	Phvul.010G126600	Phvul.010G126600.1	378	125	9,77	13,45	2
Pv6	Phvul.007G197700	Phvul.007G197700.1	384	127	9,15	13,65	1
Pv7	Phvul.006G089000	Phvul.006G089000.3	378	125	9,81	13,40	1
Pv8	Phvul.006G089000	Phvul.006G089000.2	390	129	9,20	14,04	1
Mt1	Medtr2g014240	Medtr2g014240.1	339	112	9,57	12,39	3
Mt2	Medtr2g014240	Medtr2g014240.2	333	110	9,91	12,14	3
Mt3	Medtr2g014240	Medtr2g014240.3	330	109	9,05	11,99	3
Mt4	Medtr1g083440	Medtr1g083440.1	387	128	9,39	13,83	1
Mt5	Medtr1g083440	Medtr1g083440.2	399	132	7,91	14,47	1

Mt6	Medtr1g083440	Medtr1g083440.3	360	119	9,22	11,19	1
Mt7	Medtr7g112860	Medtr7g112860.1	375	124	9,20	13,37	1
Mt8	Medtr7g112860	Medtr7g112860.2	387	128	9,20	13,99	1
Mt9	Medtr7g112860	Medtr7g112860.3	315	104	9,22	11,19	1
Mt10	Medtr8g022300	Medtr8g022300.1	372	123	9,20	13,37	2
Mt11	Medtr8g022300	Medtr8g022300.2	327	108	9,81	11,75	2
Mt12	Medtr8g022300	Medtr8g022300.3	369	122	9,39	13,34	2
Tp1	Tp57577_TGAC_v2_mRNA17073	Tp57577_TGAC_v2_mRNA17073	339	112	9,59	12,42	3
Tp2	Tp57577_TGAC_v2_mRNA18335	Tp57577_TGAC_v2_mRNA18335	396	131	9,45	14	1
Tp3	Tp57577_TGAC_v2_mRNA18334	Tp57577_TGAC_v2_mRNA18334	408	135	6,73	14,56	1
Tp4	Tp57577_TGAC_v2_mRNA34318	Tp57577_TGAC_v2_mRNA34318	495	164	9,99	17,90	1
Tp5	Tp57577_TGAC_v2_mRNA17235	Tp57577_TGAC_v2_mRNA17235	378	125	-	-	2
At1	AT1G28330	AT1G28330.5	480	159	9,77	17,4	3
At2	AT1G28330	AT1G28330.3	399	132	9,39	14,397	3
At3	AT1G28330	AT1G28330.2	399	132	9,39	14,397	3
At4	AT1G28330	AT1G28330.1	369	122	10,09	13,40	3
At5	AT1G28330	AT1G28330.4	378	125	9,98	13,80	3
At6	AT2G33830	AT2G33830.2	327	108	9,69	11,65	3
At7	AT2G33830	AT2G33830.1	321	106	9,69	11,49	3
At8	AT5G44300	AT5G44300.1	345	114	9,39	12,31	3
At9	AT1G56220	AT1G56220.3	423	140	9,10	14,77	1
At10	AT1G56220	AT1G56220.1	414	137	9,10	14,51	1
At11	AT1G56220	AT1G56220.4	330	109	6,26	11,39	1
At12	AT1G56220	AT1G56220.2	339	112	9,15	11,81	1

At13	AT1G54070	AT1G54070.1	372	123	7,79	13,09	2
Br1	Brara.I02953	Brara.I02953.1	387	128	9,10	14,03	3
Br2	Brara.I02953	Brara.I02953.2	357	118	10,10	13,04	3
Br3	Brara.E01025	Brara.E01025.1	324	107	9,69	11,60	3
Br4	Brara.C01720	Brara.C01720.1	399	132	10,29	14,56	3
Br5	Brara.B02779	Brara.B02779.1	345	114	9,69	12,32	3
Br7	Brara.C02795	Brara.C02795.1	387	128	9,15	13,64	1
Br8	Brara.F00073	Brara.F00073.1	378	125	8,08	12,87	2
Br9	Brara.I00181	Brara.I00181.1	366	121	8,08	12,87	1
Br10	Brara.B02625	Brara.B02625.1	384	127	9,39	13,51	1
Br11	Brara.A03208	Brara.A03208.1	210	69	10,13	74,43	2
Br13	Brara.E02706	Brara.E02706.1	270	89	6,81	71,89	2

5.3.2 Análise pelo método de *K-means* e análise filogenéticas dos membros da família DRM1/ARP

Observou-se que as proteínas das quatro leguminosas, de *A.thaliana* e de *B.rapa*, formam três grupos bem definidos pelas análises de *k-means* (Figura 4). Para analisar a relação filogenética entre os membros da família DRM1/ARP, todas as sequências de proteínas de cada grupo foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas no MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

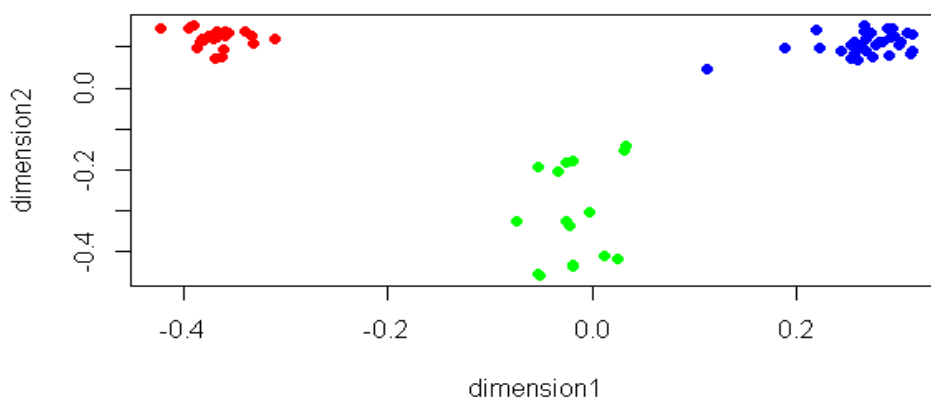


Figura 4: Análise de agrupamentos das proteínas DRM1/ARP. As cores vermelha, verde e azul representam os grupos 1, 2 e 3 respectivamente de proteínas DRM1/ARP em quatro leguminosas, *B. rapa* e *A. thaliana*.

Observou-se que as proteínas das quatro leguminosas agrupam-se nos três grupos, sugerindo que a sequência-específica da família surgiu antes da especiação das leguminosas (Park e Han, 2003). Portanto, devido ao elevado nível de conservação entre os genes DRM1/ARP, essa família pode ter surgido antes da separação filogenética entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (Figura 5). Provavelmente, o padrão de conservação manteve-se nas espécies, em virtude da função essencial para o desenvolvimento e crescimento nas plantas superiores (Park e Han, 2003). Entretanto, observa-se que no grupo 2, as proteínas Gm21, Gm22, Gm23, Gm24, Gm25, Gm26, Gm27 formam um clado exclusivo de soja, provavelmente esses transcritos podem ter uma função espécie específica (Figura 5 b).

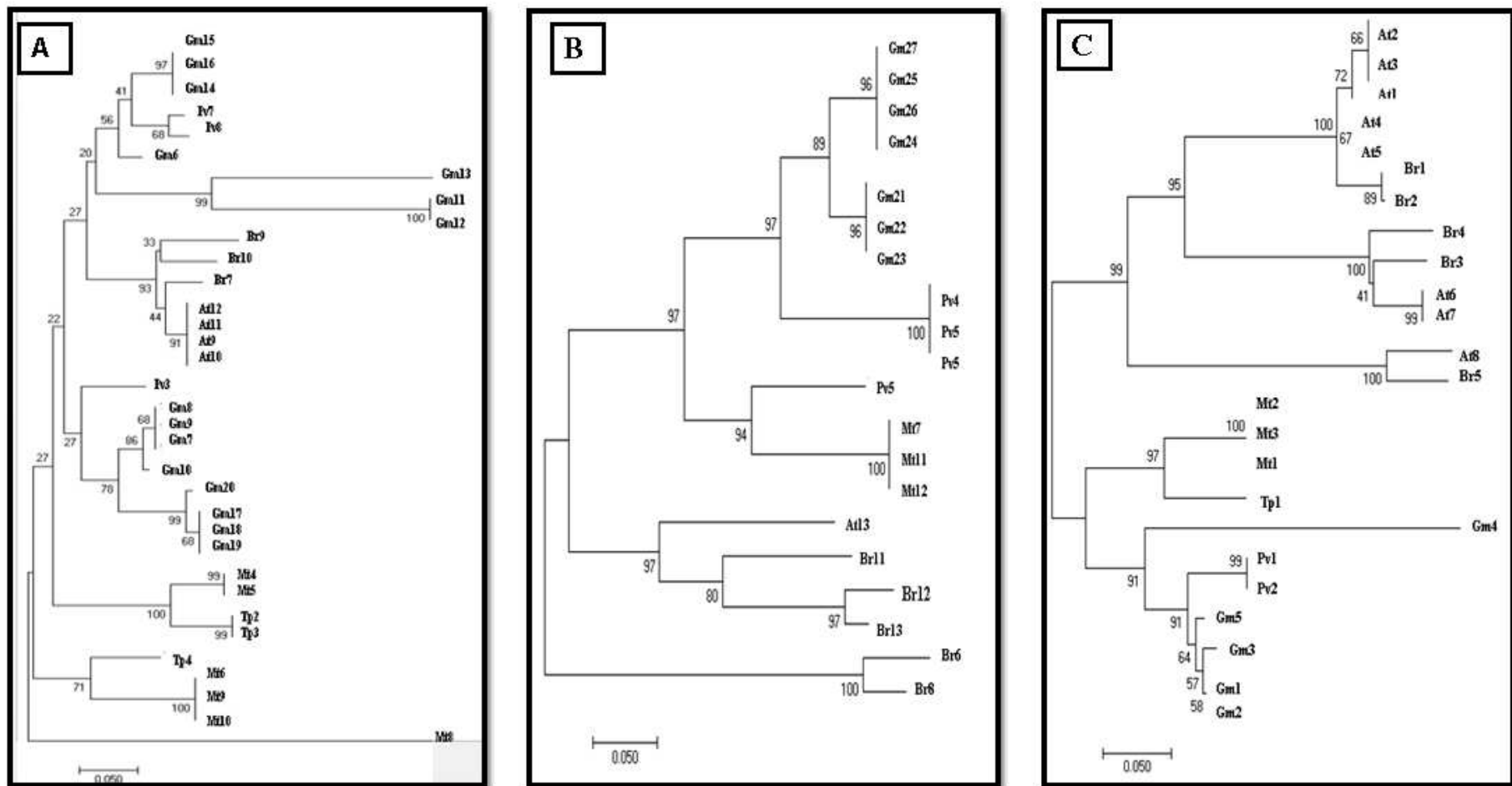


Figura 5: Arvore filogenética das proteínas DRM1/ARP de 4 leguminosas, *A.thaliana* e *B.rapa* de cada grupo. As sequências das proteínas foram utilizadas para construir a arvore filogenética no MEGA7.0. Com *bootstrap* de 1000. O código de identificação de cada proteína está na tabela 10. A) Proteínas do grupo1. B) Proteínas do grupo2. C) Proteínas do grupo3.

5.3.3 Análises de expressão dos grupos da família DRM/ARP em tecidos soja

Para avaliar a expressão dos grupos de DRM1/ARP em soja, os oligonucleotídeos foram desenhados para anelar em todos ou a maioria dos transcritos daquele grupo. Os oligonucleotídeos que anelava em todos os transcritos do grupo 3, apresentaram uma eficiência de reação 1,65, assim foi descartado. Então obteve-se um par de oligonucleotídeo que anelava apenas nos transcritos primários dos genes Glyma.13G237000 e Glyma.15G076500, designado como GmARP15g na Tabela 11. Os outros oligonucleotídeos apresentaram eficiência de reação aceitável variando de 0,8 a 1 (Tabela 11).

Tabela 11. Eficiência e concentração de uso dos oligonucleotídeos na qRT-PCR

Oligonucleotídeos	Eficiência	Concentração (µM)
Grupo1ARP	1	2,5
Grupo2ARP	0,98	2,5
Grupo3ARP	1,65	2,5
GmARP15g	1	2,5
GmTir1	0,84	2,5
ExpA-Rv	0,91	2,5
GmAux/IAA	0,95	2,5
GmARF	0,97	2,5
GmASA1	0,96	2,5
GmVSP21	1	2,5
GmCYP2-Rv	0,92	2,5
Gm ELF1A	0,81	2
GmTUA5	0,96	2,5
GmELF1B	0,81	2,5

Os genes *DRM1/ARPs* têm sido relacionados com a repressão do crescimento vegetal e a manutenção de dormência em gemas (Wood *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Entretanto, o envolvimento da família com crescimento e desenvolvimento em soja ainda não foi estudado. Em busca de informações sobre o papel

dos genes *DRM1/ARP* no desenvolvimento/crescimento de soja, avaliou-se o perfil espacial de expressão dessa família, por meio de qRT-PCR em quatro tecidos diferentes (raiz, caule, folha e semente madura) de plantas de soja.

Observou-se uma maior expressão dos três grupos em raiz (Figura 6). Em *B. rapa*, os genes *BrARP1* e *BrDRM1* tem alto níveis de transcritos em raiz, hipocótilo, folha madura, pétalas e sépalas (Lee *et al.*, 2013). Alguns transcritos alternativos dos genes *AtDRM1* e *AtDRM2* exibem um perfil semelhante de expressão em vários tecidos, sendo relativamente maior em tecido dormente ou em que o crescimento cessou (Rae *et al.*, 2014). A maior expressão dos grupos de DRM1/ARP em raízes de soja, pode estar relacionado com alguma função específica dessa família nesse órgão.

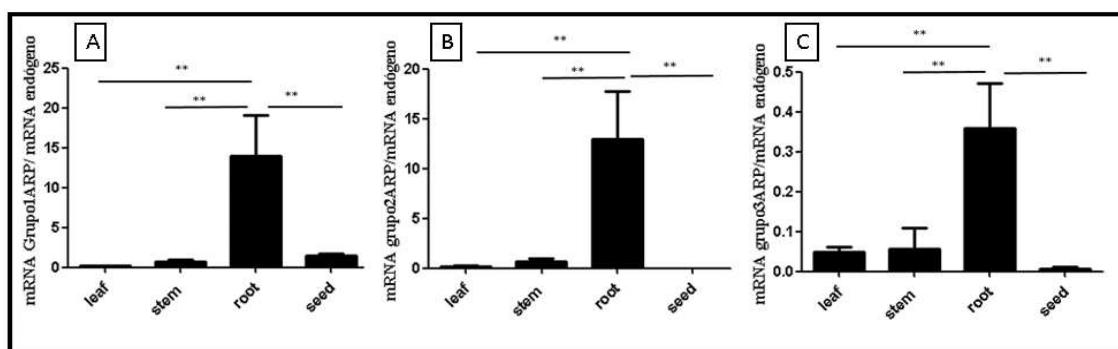


Figura 6: Perfil de expressão dos membros dos grupos 1, 2 e 3 de DRM1/ARP em diferentes tecidos (folha, caule, raiz e semente) do cultivar CD206 de soja. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em quatro tecidos de soja. Os asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias os órgãos analisados, pelo teste *Bonferroni's Multiple Comparison* $P < 0,05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas (sendo que cada réplica representa um *pool* de três plantas diferentes, e 20 sementes diferentes) e duas réplicas técnicas cada. A expressão dos genes *GmCYP2*, *GmELF1A* e *GmUBC4* foram utilizados para normalização de cada amostra.

5.3.4 Análises de expressão dos grupos da família DRM1/ARP de soja em resposta ao tratamento com os hormônios IAA e MeJA

O perfil transcricional dos grupos da família DRM1/ARP foi analisado em resposta ao tratamento de folhas de soja com os hormônios vegetais IAA e MeJA. Como esperado o tratamento com os hormônios causou a ativação da expressão dos genes marcadores *GmAUX/IAA* e *GmVSP2*. O gene responsivo a auxina *GmAUX/IAA* foi induzido após 12 h de tratamento com 100 μ M de IAA, confirmando a ativação da via sinalização mediada por esse hormônio (Figura 7).

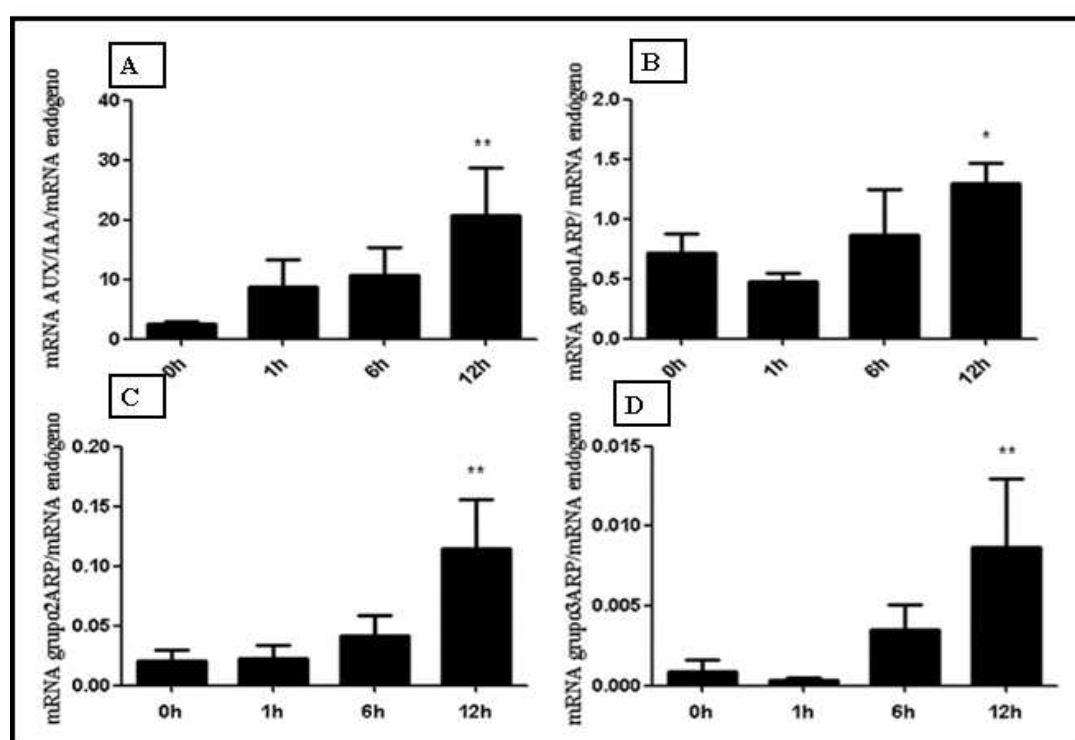


Figura 7: Perfil de expressão do *GmAUX/IAA* (A) e dos membros dos grupos 1 (B), 2 (C) e 3 (D) da família DRM1/ARP no cultivar CD 206 em resposta ao tratamento com 100 μ M de IAA. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 1h, 6h e 12h após o tratamento com IAA. Os asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias dos tratamentos (tempo 1, 6 e 12h) e do controle (tempo zero), pelo teste *Dunnnett's Multiple Comparison* $P < 0,05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas (sendo que cada réplica representa um *pool* de três plantas diferentes) e duas réplicas técnicas cada. A expressão dos genes *GmCYP2*, *GmELF1A* e *GmUBC4* foram utilizados para normalização de cada amostra.

Os três grupos da família DRM1/ARP foram induzidos em folhas de soja tratadas com auxina após 12h (Figura 7). Desta forma, os genes de soja podem ser classificados como uma família de genes de resposta tardia à auxina, uma vez que os genes de resposta primária são induzidos rapidamente após a aplicação deste hormônio, geralmente entre 5-60 minutos (Abel e Theologis, 1996). As principais famílias de genes de resposta primária são: *ARF*, *AUX/IAA* e *GH3* (Abel e Theologis, 1996; Shen *et al.*, 2015). Os fatores de transcrição ARF são importantes componentes da cascata de sinalização de auxina, pois atuam regulando a expressão de genes responsivos a auxina (Shen *et al.*, 2015).

A indução tardia de genes *DRM1/ARPs*, também foi observado em *Elaeagnus umbellata* e em frutos de pera (Kim *et al.*, 2007, Shi *et al.*, 2013). Esse perfil de expressão tardia pode sugerir que *DRM1/ARP* atuam a *down-stream* dos fatores de transcrição ARF. Assim pode-se especular que os genes *DRM1/ARP* são regulados pelos fatores de transcrição ARF. Embora ainda não há caracterização dos *cis*-elementos presente nos promotores dos genes *DRM1/ARPs*.

Interessantemente, o hormônio auxina é regulador do crescimento e desenvolvimento celular, enquanto, as proteínas DRM1/ARP contribuem para repressão do crescimento (Verhage *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013). Assim é possível que as proteínas DRM1/ARPs reprimem ou interferem de alguma forma na ação deste hormônio, em determinados tecidos por um mecanismo ainda desconhecido.

O perfil transcricional dos genes *DRM1/ARPs* em resposta ao tratamento com auxina ainda é controverso. Inicialmente, alguns genes foram caracterizados por serem reprimidos por auxina. O nível dos transcritos de *RpARP* da leguminosa *Robinia pseudoacacia* decresceram após 3 horas de tratamento com auxina exógena, extinguindo-se completamente após 6 horas (Park e Han., 2003). Interessantemente, os transcritos re-accumularam rapidamente quando o tecido foi transferido para meio MS sem auxina (Park e Han., 2003). Em arábida os transcritos alternativos dos genes *AtDRM1* e *AtDRM2* são reduzidos em resposta ao IAA (Rae *et al.*, 2014).

Comprovou-se no tratamento com MeJA que a via de sinalização desse hormônio foi ativada, pois observou-se a indução da expressão do gene *GmVSP2*, marcador dessa via. MeJA induziu a expressão apenas do grupo 3, os transcritos dos outros grupos não foram afetados por esse hormônio (Figura 8). Em arábida todos os transcritos dos genes *AtDRM1* e *AtDRM2*, exceto *AtDRM1.4*, decrescem em resposta a aplicação de

MeJA.

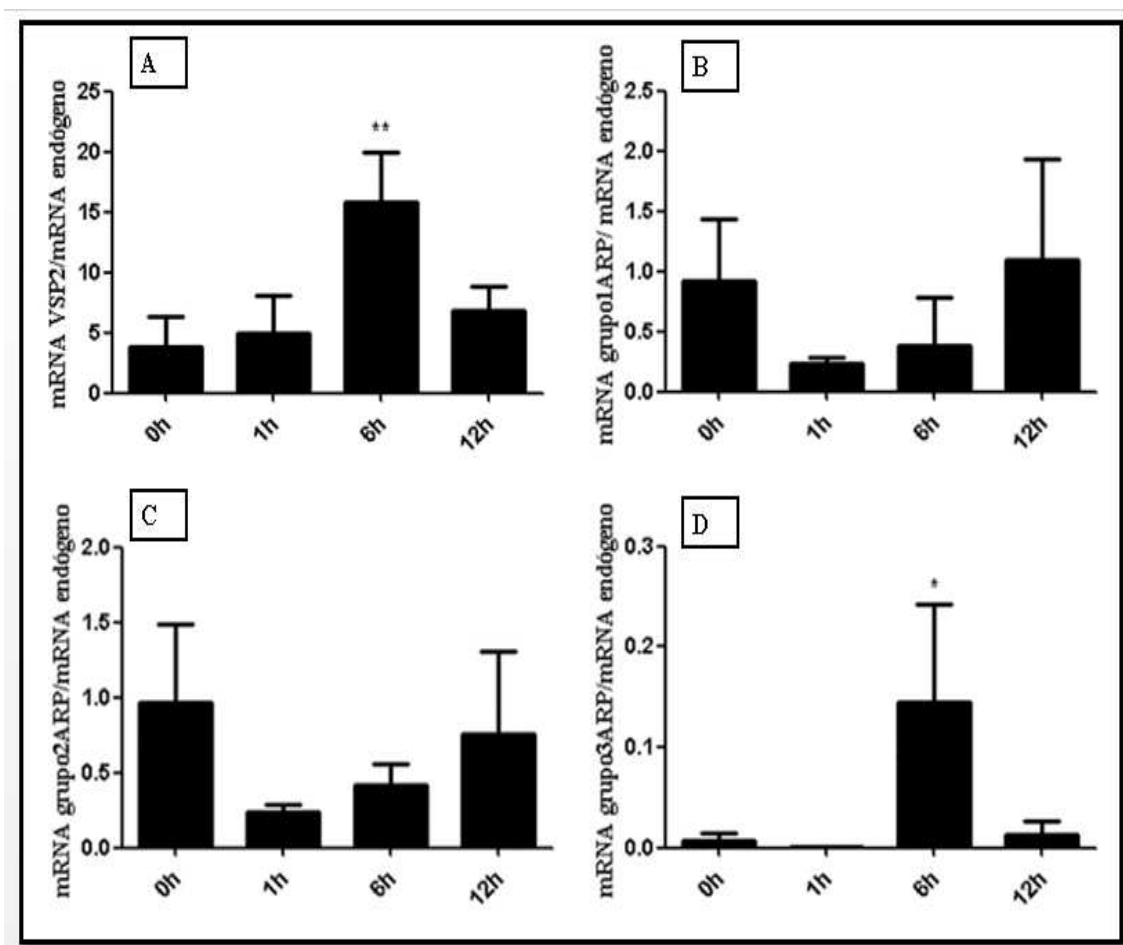


Figura 8: Perfil de expressão do gene *GmVSP2* (A) e dos membros dos grupos 1 (B), 2(C) e 3(D) da família *DRM1/ARP* no cultivar CD 206 em resposta ao tratamento com 100 μ M de MeJA. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 1h, 6h e 12h após o tratamento com IAA. Os asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias dos tratamentos (tempo 1, 6 e 12h) e do controle (tempo zero), pelo teste Dunnett's Multiple Comparison $P < 0,05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas (sendo que cada réplica representa um *pool* de três plantas diferentes) e duas réplicas técnicas cada. A expressão dos genes *GmCYP2*, *GmELF1A* e *GmUBC4* foram utilizados para normalização de cada amostra.

5.3.5 Análises de expressão dos grupos da família *DRM1/ARP* em resposta a infecção por *M.javanica*

Avaliou-se a influência da infecção pelo nematóide *M.javanica* em raízes do cultivar Desafio, sobre os grupos 1, 2 e 3 da família *DRM1/ARP*. Pode-se observar que os grupos

1 e 3 são responsivos a esse patógeno, sendo induzidos após 3 dias de infecção, sugerindo que esta família tenha um papel nas interações compatíveis entre soja e nematóide (Figura 9). A expressão diferencial de *DRM1/ARP* durante a infecção foi previamente demonstrada. Dois genes da família *DRM1/ARP* foram identificados a partir de uma biblioteca de cDNA de cultivar resistente (PI 595099) sintetizada após infecção de nematóides em soja (De Sá et al., 2012). Na cultivar de amendoim resistente (*Arachis stenosperma*), os genes *DRM1/ARP* foram induzidos, enquanto a cultivar de amendoins susceptíveis apresentou níveis reduzidos de transcritos de *DRM1/ARP* após infecção com *M. arenaria* (Proite et al., 2007; Guimarães et al., 2010).

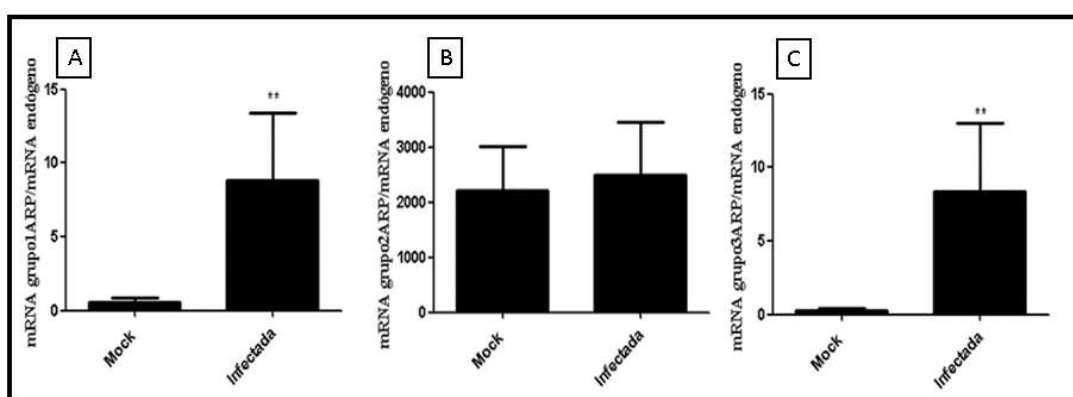


Figura 9: Perfil de expressão dos membros dos grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) de DRM1ARP no genótipo suscetível durante a infecção por *M.javanica*. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 3 dias após a inoculação. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o controle (Mock) e tratamento (Infectada), pelo teste t $P < 0.05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas de cada amostra. A expressão dos genes *GmTUA5* e *GmCYP2* foram utilizados para normalização de cada amostra.

5.3.6 Análises de expressão dos grupos da família DRM1/ARP e genes relacionados com auxinas em resposta a infecção por *P. pachyrhizi*

Para detectar as mudanças nos padrões de expressão dos grupos durante a infecção com o fungo, o perfil de expressão foi comparado entre plantas MOCK e inoculadas de cultivar suscetível (Embrapa 48). O grupo 1 foi induzido em 12h de infecção, enquanto os grupos 2 e 3 foram reprimidos em 192 h e 24 h, respectivamente (Figura 10). Os genes

auxin-repressed do cafeeiro (*Coffea arabica*) são induzidos na interação entre o fungo *Hemileia vastatrix* (Barka *et al.*, 2017).

O grupo 3 é reprimido em 24 horas após a inoculação. Esse grupo é o único induzidos por MeJA (Figura 8). O fungo embora classificado como fungo biotrófico parece mimetizar característica de um patógeno necrotrófico. Barros (2016) mostrou que os genes *GmPDF1.2* e *GmVSP2*, responsivos a MeJA são induzidos em 12 horas após a infecção em cultivar suscetível infectada. Enquanto o gene marcador *GmPRI* de SA são induzidos em 48 horas. Sugerindo um pico de MeJA no início da infecção seguido por uma queda que coincide com aumento de SA a medida que a infecção progride (Barros, 2016).

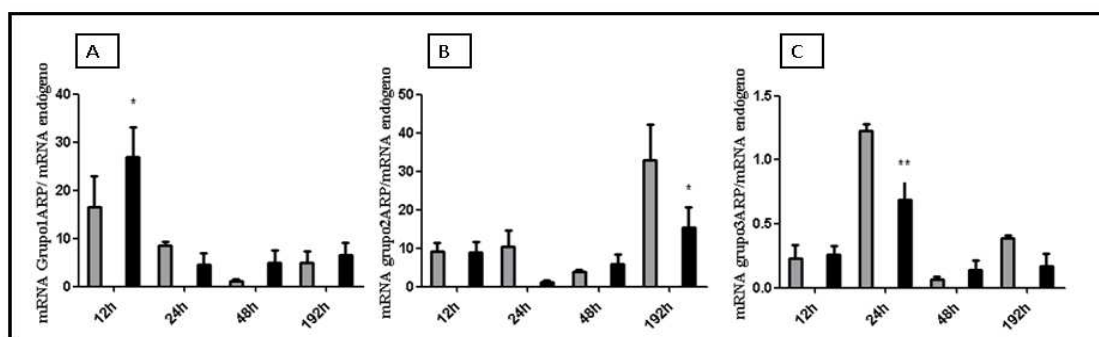


Figura 10: Perfil de expressão dos membros dos grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) da família DRM1/ARP no genótipo suscetível (EMBRAPA48) durante a infecção por *P. pachyrhizi*. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 12, 24, 48 e 192 horas após a inoculação. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento (barra preta) e o controle (barra cinza), pelo teste *Bonferroni posttests* $P < 0.05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas cada. A expressão dos genes *GmELF1A*, *GmCYP2* e *GmUBC4* foram utilizados para normalização de cada amostra.

O envolvimento dos genes responsivos a auxina em interações com fungo *P. pachyrhizi* ainda não foi relatado. Para compreender melhor a possível estratégia de infecção desse fungo, avaliou-se o perfil o perfil de expressão de cinco genes relacionados com a sinalização de auxinas: *GmTIR1*, *GmASB1*, *GmARF*, *GmAUX/IAA* e *GmExpA* em cultivar suscetível infectada com o fungo *P. pachyrhizi*. Os genes *GmAUX/IAA* e *GmASB1* não apresentaram alterações no número de transcritos, mas os genes *GmExpA*

e *GmARF* foram reprimidos após 24h de infecção, enquanto os genes *GmARF* e *GmTIR1* foram induzidos em 192h (Figura 11).

Os genes *GmTIR1* e *GmARF* são induzidos durante interações compatíveis, portanto a sinalização de auxina é modulada durante a infecção por esse patógeno biotrófico (Figura 11). As auxinas promovem suscetibilidade em resposta a alguns patógenos biotróficos, pois contribuem para disponibilidade de nutrientes para esses patógenos, visto que as auxinas também promovem crescimento (Glazebrook, 2005; Ding *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2012). Entretanto, não foi observado alteração significativa no perfil de expressão do gene *GmExpA*, que codificam as expansinas envolvidas no afrouxamento da parede celular (Ding *et al.*, 2008).

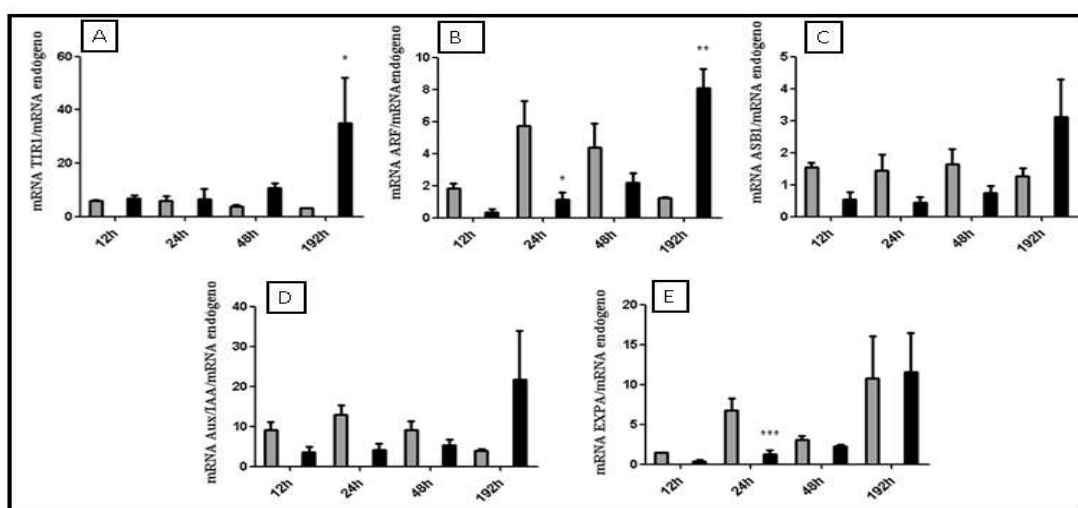


Figura 11: Perfil de expressão dos *GmTIR1* (A), *GmARF* (B), *GmASB1* (C), *GmExpA* (D) e *GmAUX/IAA*(E) no genótipo suscetível (EMBRAPA48) durante a infecção por *P. pachyrhizi*. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 12, 24, 48 e 192 horas após a inoculação. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o tratamento (barra preta) e o controle (barra cinza), pelo teste *Bonferroni posttests* $P < 0.05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas. A expressão dos genes *GmELF1A*, *GmCYP2* e *GmUBC4* foram utilizados para normalização de cada amostra.

5.4 Identificação de parceiros de interação da proteína GmARP15g

Os membros da família DRM1/ARP foram descritas por apresentarem uma estrutura intrinsecamente desorganizada (IDPs), em *A. thaliana* e kiwi (Wood *et al.*, 2013; Rae *et al.*, 2014). As IDPS são importantes componentes em vias, e devido a sua estrutura flexível, são capazes de interagir com vários parceiros, e também atuar como proteínas *hub* em cascatas de sinalização (Wood *et al.*, 2013). Assim, com a finalidade de identificar alvos celulares para a proteína GmARP15g, foi realizada uma triagem de uma biblioteca de cDNA (Alves *et al.*, 2011), utilizando GmARP15g como isca, por meio do sistema de duplo híbrido em leveduras.

A triagem resultou no isolamento de 30 clones em meio SD- Leu-Trp-His. Entretanto, 3 clones de leveduras: pBD-GmARP15g + pAD-bbt 5, pBD-GmARP15g + pAD-bbt 16 e pBD-GmARP15g + pAD-bbt 28, cresceram em meio quando adicionado 2,5 mM de 3 AT. As leveduras expressando as construções pBD-GmARP15g + pAD-bbt 16 e pBD-GmARP15g + pAD-bbt 28 cresceram em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina, e no mesmo meio seletivo acrescido com até 15 mM de 3AT, entretanto, a levedura com as construções pBD-GmARP15g + pAD-bbt 5 cresceu até 7,5 mM de 3 AT. Os controles negativos pBD +pAD, pBD+pAD-GmARP15g e pBD-GmARP15g+ pAD cresceram apenas em meio deficiente em leucina e triptofano, confirmando a presença dos dois vetores (Figura 12).

Para identificação dos possíveis parceiros de GmARP15g os plasmídeos foram sequenciados, e as sequências utilizadas para buscas via BLASTx nos bancos de dados NCBI (Benson *et al.*, 2014) e Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012). O clone isolado da levedura BD-GmARP15g + AD-bbt 5, apresentou 93% de similaridade com o *locus* Glyma.04G249700.

O *locus* Glyma.04G249700 codifica a proteína *Photosystem II Subunit S Photosystem II 22kD- psbS*, de 273 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 22 KDa. O gene pertence à família *Chlorophyll A-B binding protein*. Essa proteína faz parte juntamente com outros polipeptídios do supercomplexo fotossistema II (PSII). A função de *PsbS* é dissipar a energia luminosa (Kim *et al.*, 1992; Dominici *et al.*, 2002).

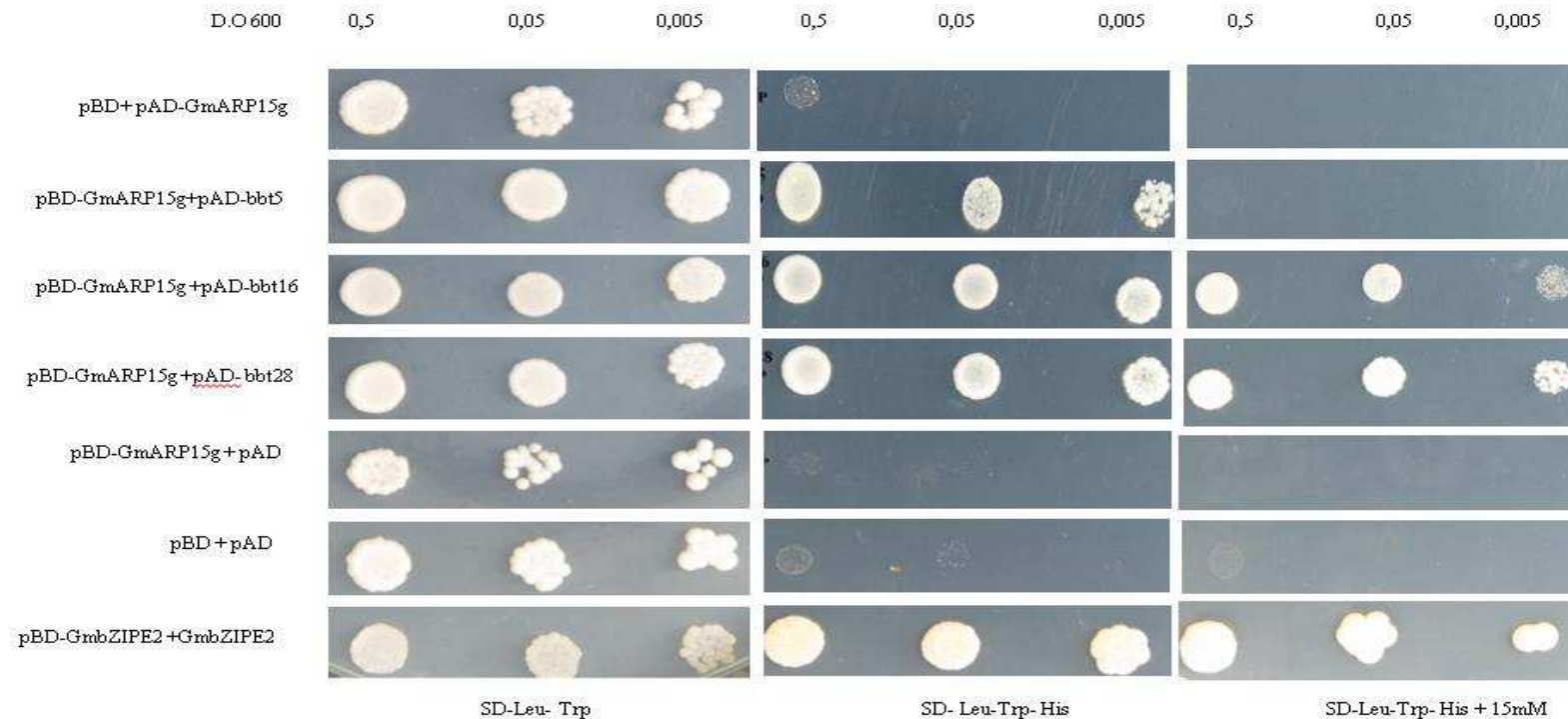


Figura 12: Identificação de parceiros que interagem com a proteína de GmARP15g no sistema de duplo híbrido de leveduras. Crescimento das colônias em meios sólidos seletivos SD- Leu-Trp (três dias), SD-Leu-Trp (cinco dias) e SD-Leu-Trp-His (sete dias) com 15 mM de 3-AT após a incubação a 30 °C. O ensaio foi realizado com os clones: pBD- vazio + pAD-GmARP15g, pBD-GmARP15g + p AD-bbt 5, pBD-GmARP15g + pAD-bbt 16, pBD-GmARP15g + pAD-bbt 28, pBD-vazio + pAD-vazio, pBD-GmARP15g + pAD-vazio, pBD-vazio + pAD-vazio e pBD-GmbZIPE2+ pAD-GmbZIPE2 com as gotas são referentes a DO 0,5, 0,05 e 0,005. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e como controle positivo foi utilizado a proteína GmbZIPE2, que é capaz de formar homodímeros (Alves, 2015).

PsbS é capaz de interagir com várias outras proteínas, inclusive com a Lhcb1, um dos principais componentes de LHC II, que provavelmente contribuem para sua importante função evitando dano fotoquímico em plantas, dissipando o excesso de energia luminosa (Gerotto *et al.*, 2015; Correa-Galvis *et al.*, 2016).

Os clones AD-bbt 16 e AD-bbt 28 não foram identificadas, devido à baixa qualidade do sequenciamento. Serão realizadas tentativas futura para identificação desses parceiros de interação.

5.5 Silenciamento dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* em soja

5.5.1 Silenciamento do gene *GmbZIP105* induz a expressão do gene *GmPRI*

Os oligonucleotídeos para clonagem parcial do gene *GmbZIP105* foram desenhados na região C-terminal da sequência CDS. Não foi possível obter uma região que fosse exclusiva para o gene *GmbZIP105*, em virtude da identidade elevada com o gene *GmbZIP104* (Glyma.19G244800), tanto em nível de DNA (96 %), quanto em nível de proteína (87 %) (Figura suplementar 4). Desta forma, apenas 14 pb são diferentes entre ambos os genes na região clonada. Provavelmente, o experimento resultou no silenciamento dos dois genes *GmbZIP104* e *GmbZIP105*. Para a confirmação do silenciamento por qRT-PCR, os oligonucleotídeos foram desenhados em uma região que é conservada entre os dois genes (Figura suplementar 4). O par de oligonucleotídeo foi testado e definiu-se a concentração ideal (0,5 µM) e a eficiência da reação (0,93), para ser utilizado nas análises de expressão do gene *GmbZIP105* em plantas silenciadas e controle.

As plantas silenciadas apresentaram um aspecto enrugado das folhas mais jovens principalmente, redução do crescimento vegetativo e antecipação da floração, como pode ser observado na figura 13 B. Além das características fenotípicas características da presença do vírus, o silenciamento de *GmbZIP105* foi confirmado após 48 horas de infecção com o fungo, conforme o resultado de qRT-PCR (Figura 14 A).



Figura 13: Plantas de soja cultivar Williams 82 silenciadas para o gene *GmbZIP105*. A) Plantas a esquerda silenciada e a direita o controle. B) Plantas a esquerda silenciada e a direita o controle, ambas infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*. C) Lesões na folha de plantas silenciadas infectadas com *P. pachyrhizi*.

As plantas silenciadas para o gene *GmbZIP105* e infectadas com *P. pachyrhizi*, apresentaram nas folhas além de danos características da infecção do fungo e do vírus, lesões similares a evidenciadas em HR (Figura 13 C). Considerando que ativação de HR envolve a via de sinalização de SA, avaliou-se a expressão dos genes responsivos a SA *GmTGA2*, *GmPR1* e *GmPR2* em plantas controle e silenciadas após 48 horas de infecção com *P. pachyrhizi*. As plantas silenciadas tiveram uma leve indução na expressão do gene *GmPR1*. Entretanto, os genes *GmTGA2* e *GmPR2* não tiveram diferença significativa (Figura 14 C e D). O gene *GmPR1* foi induzido em 48 h após a infecção com *P. pachyrhizi* no cultivar suscetível (Embrapa 48) (Alves *et al.*, 2015; Barros 2016). A indução de *GmPR1* em plantas silenciadas e infectadas com este fungo, pode contribuir para o aumento de resistência da planta a infecção. Visto que as análises fenotípicas sugerem uma redução da severidade da doença em plantas silenciadas, estes experimentos ainda serão finalizados.

Alves *et al.* (2015), estudou 4 genes *bZIPs* de soja responsivos ao fungo da ferrugem asiática, *GmbZIPE1*, *GmbZIPE2*, *GmbZIP62* e *GmbZIP105*. O gene *GmbZIP105* tem uma forte indução após 48 horas de infecção, em interações compatíveis entre plantas de soja e este fungo. O gene *GmbZIP105* tem um pico de expressão após duas horas de tratamento com SA e seis horas de MeJA. Ambos os hormônios são importantes mediadores de resposta de defesa em plantas. Esses resultados sugerem uma possível função desse gene em interações compatíveis (Alves *et al.*, 2015). Para investigar melhor a função desse gene em resistência de plantas a doença, realizou-se o VIGS e a infecção dessas plantas com *P. pachyrhizi*, onde observou-se um aumento da resistência das plantas silenciadas. Assim estes resultados podem sugerir que o gene *GmbZIP105* atue de alguma forma favorecendo a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* em plantas suscetíveis, pois o silenciamento deste gene resultou em um aumento da resistência das plantas silenciadas a infecção. Os resultados do silenciamento de *GmbZIP105* forneceu mais uma evidência do envolvimento deste gene em resposta a patógeno.

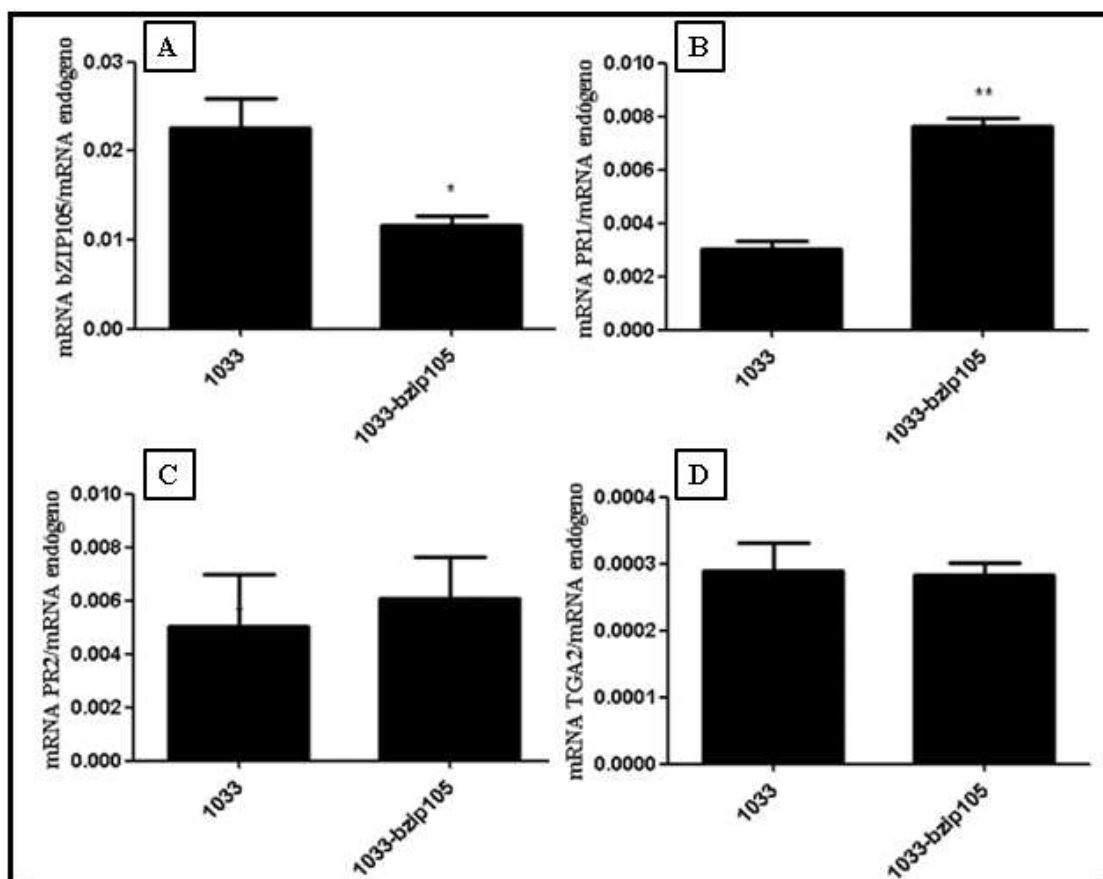


Figura 14: Perfil de expressão dos genes *GmbZIP105* (A), *GmPR1* (B), *GmPR2*(C) e *GmTGA2*(D) em genótipos Williams 82 infectados por *P. pachyrhizi*. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 48 após a inoculação. Os asteriscos indicam diferença significativa entre as médias do tratamento (planta silenciada 1033-bZIP105) e do controle (vetor 1033 vazio), pelo teste t $p < 0.05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas (sendo que cada réplica representa um pool de três plantas diferentes) e duas réplicas técnicas cada. A expressão do gene *GmCYP2* foi utilizado para normalização de cada amostra.

Vários membros da família *bZIP* foram relatados por serem responsivos a patógenos em diferentes espécies, sendo uma importante função desempenhada por esses fatores de transcrição em plantas (Alves *et al.*, 2013). A função dos *bZIPs* em relação a resposta a patógeno varia de espécie para espécies. Em pimentão, o silenciamento do gene *CabZIP2*, resulta no comprometimento da resposta imune durante interações

incompatíveis, evidenciado pela redução da expressão dos genes marcadores de defesa *CaPR1* e *CaAMP* (Lim *et al.*, 2015). Resultados similares são observados em mandioca, quando os genes *MebZIP3* e *MebZIP5* são silenciados, ocorre uma redução do nível dos transcritos de *MePR1*, *MePR2*, *MePR3* e *MePR4*. Assim provavelmente a resistência mediada por esses *bZIPs*, em ambas as espécies é dependente de SA (Lim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

5.5.2 Silenciamento do gene *GmARP15g* resulta em maior suscetibilidade à infecção com *P. pachyrhizi*

Para desenho dos oligonucleotídeos para clonagem parcial do gene não foi possível obter uma região que fosse exclusiva para o gene *GmARP15g*. O gene *GmARP15g* possui uma identidade elevada com o gene Glyma.13G237000 (97 %) em nível de DNA e, 98,1 % em nível de proteína, desta forma, apenas 5 pb diferem entre ambos os genes na região clonada. Esses resultados sugerem que a construção de silenciamento pode afetar os transcritos de ambos os genes, e conseqüentemente ambos os genes foram silenciados (Figura suplementar 5). Para a confirmação do silenciamento por qRT-PCR, os oligonucleotídeos foram desenhados em uma região que é conservada entre os dois genes (Figura suplementar 5). O oligonucleotídeo Fw foi desenhado dentro e o Rv fora da região clonada. O par de oligonucleotídeo foi testado e definiu-se a concentração ideal (2,5 µM) e a eficiência da reação (1), para ser utilizado nas análises de expressão do gene *GmARP15g* em plantas silenciadas e controle.

O sucesso da infecção viral pode ser verificado pelo aspecto enrugado das folhas, sintoma típico da infecção por vírus. Além disso, as plantas silenciadas apresentam uma redução do crescimento vegetativo em relação ao controle (Figura 15).

O silenciamento gênico *GmARP15g* não foi detectado por qRT-PCR (Figura 16 A). Também não foi possível observar diferença significativa na expressão do gene *GmPR1* 24 horas após a infecção (Figura 11). Talvez o tempo de infecção utilizado para os experimentos de qRT-PCR não foi adequado para detecção do silenciamento ou perceber as alterações na expressão do gene *GmPR1*. Entretanto, as análises fenotípicas (dados não amostrados) mostram um aumento da frequência de esporulação por folha e severidade da doença. Esses resultados sugerem que o silenciamento desse gene pode aumentar a suscetibilidade da planta a esse patógeno.

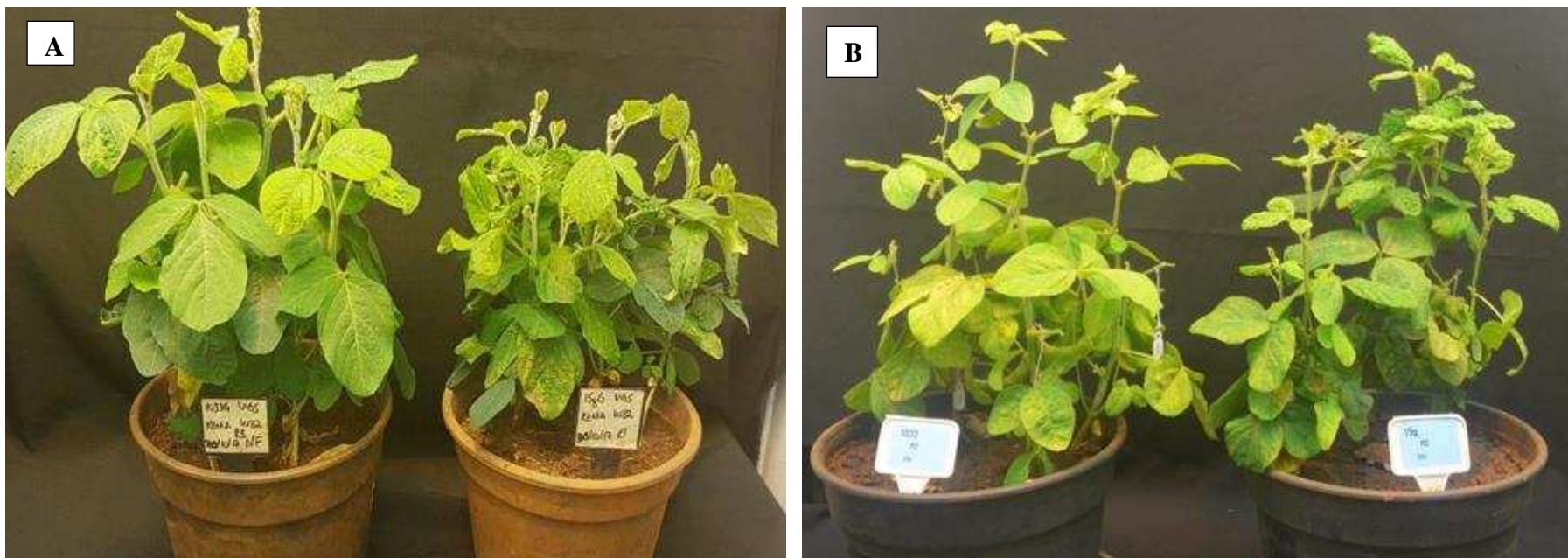


Figura 15: Plantas de soja cultivar Williams 82 silenciadas para o gene *GmARP15g*. A. Plantas a esquerda o controle e a direita silenciada. B) Plantas a esquerda controle e a direita silenciada, ambas infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*.

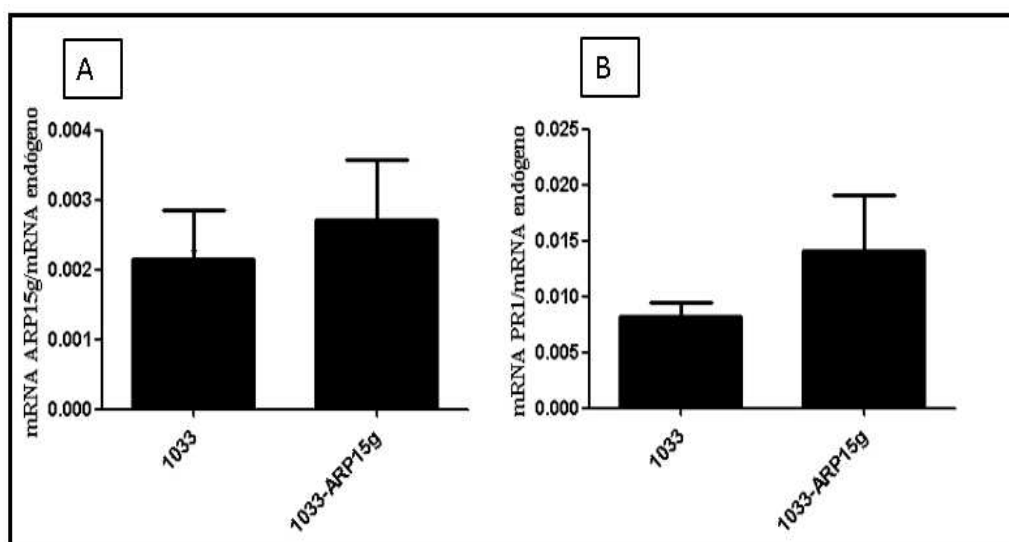


Figura 16: Perfil de expressão dos genes *GmARP15g* (A), *GmPRI*(B) no genótipo Williams 82 infectado por *P. pachyrhizi*. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 24 horas após a inoculação. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas (sendo que cada réplica representa um *pool* de folhas obtidas de três plantas diferentes) e duas réplicas técnicas cada. A expressão do gene *GmCYP2* foi utilizado para normalização de cada amostra.

Pouco genes *DRMI/ARPs* tem sido estudado até o momento, e sua função bioquímica ainda não foi elucidada. Em tabaco e trigo, membros dessa família contribuem para resposta de defesa a patógenos (Zhao *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015). O gene *GmARP15g* foi selecionado para caracterização funcional, porque, é reprimido em 24 horas após a infecção em soja suscetíveis *P. pachyrhizi* (Figura 10), além da proteína codificada por ele interagir com o fator de transcrição GmbZIP105 responsivo a *P. pachyrhizi* (Figura 3). Para determinar o papel funcional do gene *GmARP15g* em resposta à infecção por *P. pachyrhizi*, realizou-se o silenciamento desse gene por meio de VIGS, e as plantas resultantes foram infectadas com o fungo. Os dados fenotípicos de plantas silenciadas e infectadas (dados não amostrados) indicam que esse gene pode contribuir para resistência a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi*. O fato do *GmPRI* não ter sido afetado pelo silenciamento, pode indicar também que a possível resistência mediada por *GmARP15g* seja independente de SA.

5.6 Perfil de expressão do gene *GmbZIP105* em resposta à auxina

O gene *GmbZIP105* é induzido após 12 horas de tratamento com 100 μ M de auxina, indicando que é um gene responsivo a este hormônio (Figura 17). O gene *GmbZIP105* é responsivo também aos hormônios de defesa SA e MeJA (Alves *et al.*, 2015).

Já foi demonstrado que alguns fatores de transcrição bZIP reconhecem *cis*-elementos presentes nos promotores de genes responsivos a auxina (Cherenkov *et al.*, 2018). A proteína BZI1 de *N. tabacum* que pertence ao grupo C (Alves *et al.*, 2013), assim como *GmbZIP105*, parece ser um componente importante na sinalização de auxina. Este fator de transcrição se liga no promotor do gene *GH3* e promove a ativação da transcrição, em resposta a sinalização mediada por auxina (Heinekamp *et al.*, 2004). O gene *GH3* codifica uma enzima que conjuga auxina com aminoácidos, inativando assim esse hormônio (Ding *et al.*, 2008).

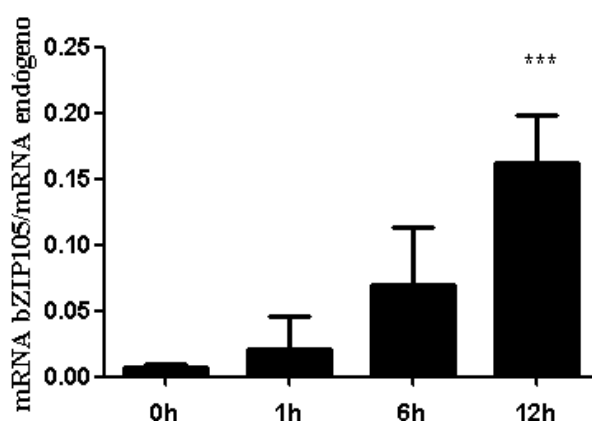


Figura 17: Perfil de expressão do gene *GmbZIP105* no cultivar CD 206 em resposta ao tratamento com 100 μ M de IAA. A quantificação relativa foi mensurada por qRT-PCR em 1h, 6h e 12h após o tratamento com IAA. Os asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias dos tratamentos (tempo 1, 6 e 12h) e do controle (tempo zero), pelo teste *Dunnnett's Multiple Comparison* $p < 0,05$. Os valores representam as médias de três réplicas biológicas (sendo que cada réplica representa um *pool* de obtida de três plantas diferentes) e duas réplicas técnicas cada. A expressão dos genes *GmCYP2*, *GmELF1A* e *GmUBC4* foram utilizados para normalização de cada amostra.

5.7 Relação funcional entre as proteínas GmbZIP105 e GmARP15g

Através de ensaios de duplo híbrido de leveduras, identificou-se a interação entre as proteínas GmbZIP105 e GmARP15g. Ao longo dos experimentos observou-se um perfil semelhante de expressão dos dois genes em tecidos de plantas de soja, em resposta ao tratamento com hormônio relacionados com defesa vegetal, infecção por patógeno, e interação ou indução de genes da fotossíntese (Alves *et al.*, 2015).

O gene *GmbZIP105* é responsivo ao tratamento com MeJA em folhas de soja, e o pico máximo de indução ocorre em seis horas após a aplicação do hormônio (Alves *et al.*, 2015). Interessantemente, o grupo 3, no qual o gene *GmARP15g* está incluso, é o único grupo da família DRM1/ARP que é responsivo a MeJA (Figura 8), exatamente no mesmo tempo que ocorre a indução de *GmbZIP105* (Alves *et al.*, 2015). MeJA é um hormônio característico de defesa contra patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Barros (2016) relatou que no início da infecção de *P. pachyrhizi* plantas suscetíveis (Embrapa 48) têm um pico de JA, caracterizado pela indução dos genes de via *GmVSP2* e *GmPDF1.2*. Por outro lado, o gene *GmPRI* só é induzido em estágios mais tardios da infecção, indicando que a via de ácido salicílico está ativada. Aparentemente, no início da infecção o fungo parece se comportar como um patógeno necrotrófico, e a planta por sua vez, dispara uma resposta para esse tipo patógeno, resultado em um pico do hormônio JA.

A infecção por patógeno causam alterações em todo o metabolismo da planta, inclusive na fotossíntese, principal fonte de energia dos tecidos verde. Alguns trabalhos relatam que a infecção por patógeno resulta em reprogramação da transcrição de genes relacionados com a fotossíntese (Bilgin *et al.*, 2010). Neste estudo, observou-se que o fator de transcrição responsivo ao patógeno *P. pachyrhizi*, GmbZIP105 promove alteração na expressão de genes relacionados a fotossíntese. Alguns genes foram modulados por este fator de transcrição. A alteração da expressão de genes da fotossíntese pode estar relacionada com a função desempenhada por este gene em interações planta-patógeno.

6 CONCLUSÃO

A superexpressão do gene *GmbZIP105* em protoplastos de soja induz a alteração na expressão nos genes envolvidos da fotossíntese.

O fator de transcrição *GmbZIP105* interage com a proteína *GmARP15g*, em ensaios de duplo híbrido de leveduras.

A soja possui 8 genes *DRM/ARPs*, que codificam 27 proteínas preditas. Os transcritos desses genes são diferencialmente expressos nos tecidos e em resposta a patógenos.

Os genes *DRM/ARPs* em soja é uma família gênica de resposta tardia à auxina.

A proteína *GmARP15g* interage com a proteína *GmPsbs* em ensaios de duplo híbrido de leveduras.

O silenciamento do gene *GmbZIP105* induz a expressão do gene *GmPRI*. Esse resultado sugere que esse gene pode ser um regulador positivo da infecção durante interações compatíveis em soja.

O silenciamento de *GmARP15g* resulta em maior suscetibilidade das plantas infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*, sugerindo uma possível função dessa proteína nas respostas de defesa.

O perfil similar de expressão dos genes *GmbZIP105* e *GmARP15g* em resposta aos hormônios, em diferentes tecidos das plantas, e em resposta a infecção por patógenos, bem como a interação de proteínas codificadas por eles, pode sugerir uma função relacionada de ambos os genes em plantas. As figuras 18, 19 e 20 são modelos propostos a partir dos resultados obtidos neste trabalho e dados da literatura, sugerindo uma relação funcional dos *GmbZIP105* e *GmARP15g* em plantas de soja suscetível com e sem infecção.

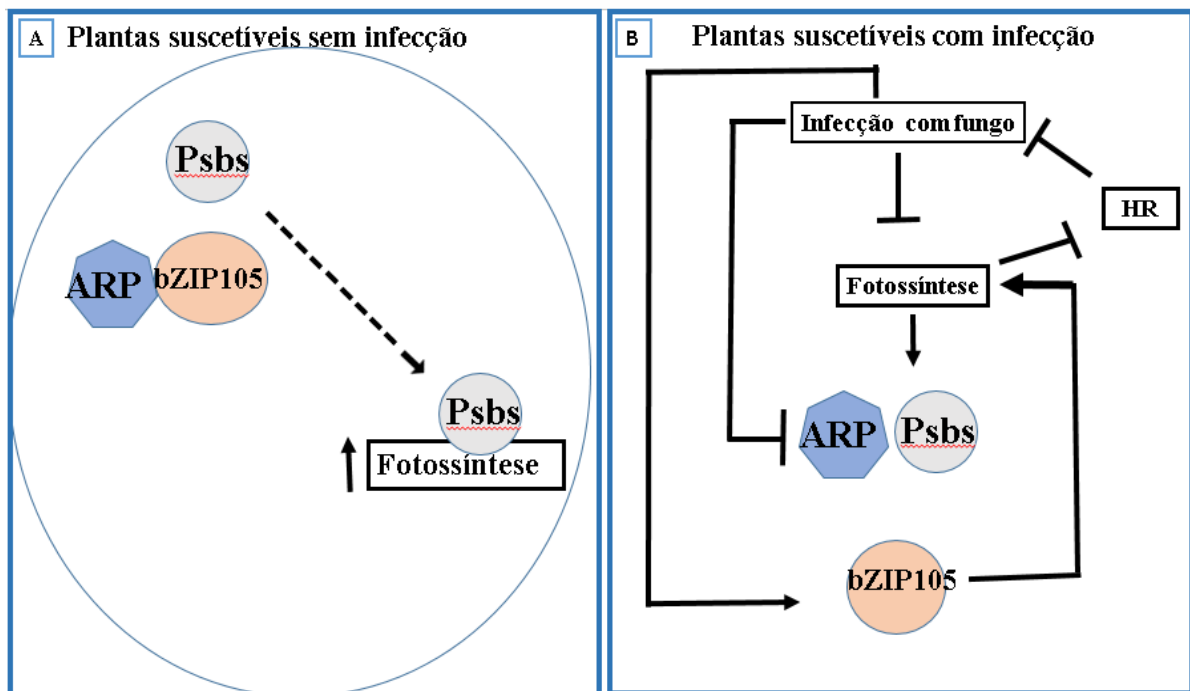


Figura 18: Modelo hipotético envolvendo de interações entre as proteínas GmARP15g, GmPsbs e GmbZIP105 em plantas suscetíveis não infectadas e infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*. O modelo é baseado em dados da literatura e em resultados obtidos neste trabalho. A) Em plantas suscetíveis sem infecção a fotossíntese se mantém elevada, e assim a proteína Psbs se mantém no cloroplasto. Provavelmente no citoplasma, GmARP15g interage com GmbZIP105, assim impedindo a atividade transcricional deste fator de transcrição. B) Em plantas suscetíveis infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*, ocorre uma redução na atividade fotossintética com isso provavelmente GmPsbs migra do cloroplasto. No citosol, GmPsbs interage com GmARP15g, deixando GmbZIP105 livre para atuar regulando a expressão gênica. GmbZIP105 induz a expressão de genes relacionados com a fotossíntese, podendo resultar no aumento da taxa fotossintética. O aumento da taxa fotossintética resulta na repressão de HR, e assim a infecção se mantém nas plantas suscetíveis.

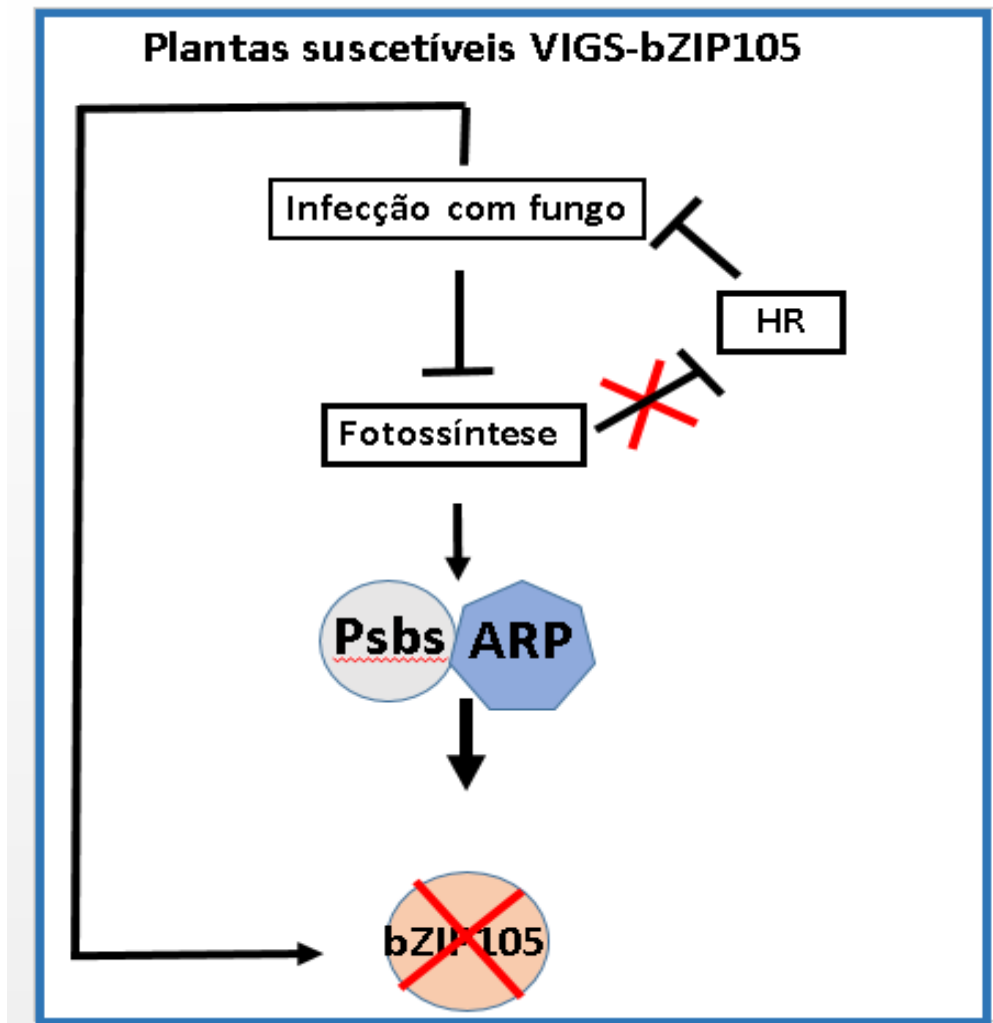


Figura 19: Modelo hipotético envolvendo de interações entre as proteínas GmARP15g, GmPsbs e GmbZIP105 em plantas suscetíveis VIGS-*GmbZIP105* e infectadas e com o fungo *P. pachyrhizi*. O modelo é baseado em dados da literatura e em resultados obtidos neste trabalho. Plantas suscetíveis infectadas com o fungo *P. pachyrhizi* reduzem a atividade fotossintética com isso provavelmente GmPsbs migra do cloroplasto. No citosol, GmPsbs interage com GmARP15g. Neste caso, devido ao silenciamento do gene *GmbZIP105*, a fotossíntese se mantém reduzida, aliviando a repressão sobre a HR, e como isso a plantas exibem um fenótipo de redução da suscetibilidade a infecção.

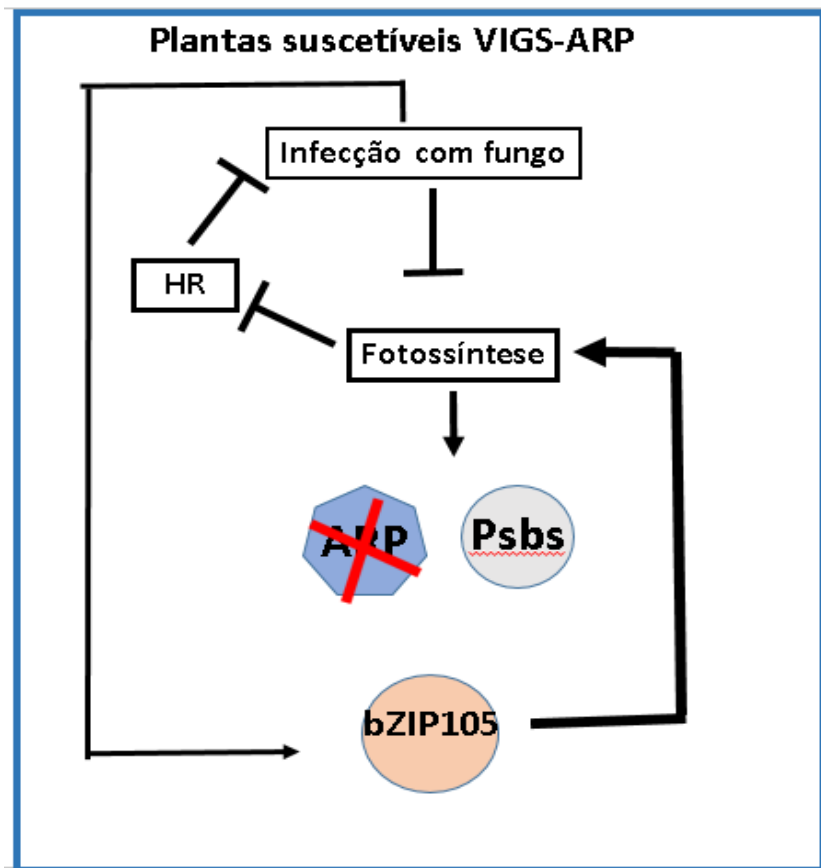


Figura 20: Modelo hipotético envolvendo de interações entre as proteínas GmARP15g, GmPsbs e GmbZIP105 em plantas suscetíveis VIGS-*GmARP15g* e infectadas com o fungo *P. pachyrhizi*. O modelo é baseado em dados da literatura e em resultados obtidos neste trabalho. Em plantas suscetíveis infectadas com o fungo *P. pachyrhizi* ocorre a redução da atividade fotossintética com isso provavelmente GmPsbs migra do cloroplasto. Neste caso, devido ao silenciamento do gene GmARP15g, o fator de transcrição GmbZIP105 fica livre para induzir a expressão de genes relacionados com a fotossíntese. A fotossíntese reprime HR, como isso a plantas exibem um fenótipo de aumento de suscetibilidade a infecção.

7 REFERÊNCIAS

- Abel, S., Theologis, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant physiology*. 111(1), 9–17.
- Andrews, S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H., 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*. *Nucleic Acids Res.* 40(1), 597-603.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool *Journal of Molecular Biology*. *J Mol Biol.* 215(3), 403-410.
- Alves, M.S, Reis, P.A., Dadalto, S.P., Faria, J.A., Fontes, E. P., Fietto, L.G. 2011. A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (22).
- Alves, M. S. 2013. Caracterização bioquímica e funcional de fatores de transcrição envolvidos na resposta a estresses biótico e abiótico em soja. Tese de doutorado em Bioquímica Agrícola. UFV. Viçosa.
- Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., De Souza, G. B., Barros, V. A., Fietto, L. G. 2013. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. *International journal of molecular sciences*. 14(4), 7815-7828.
- Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., De Souza, G. B., Barros, V. A., Fietto, L. G. 2014. Transcription factor functional protein-protein interactions in plant defense responses. *Proteomes*. 2(1), 85-106.

- Alves, M. S., Soares, Z. G., Vidigal, P. M., Barros, E. G., Poddanosqui, A. M., Aoyagi, L. N., Fietto, L. G. 2015. Differential expression of four soybean bZIP genes during *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Functional and integrative genomics*, 1-12.
- Barka, G. D.; Caixeta, E. T.; Almeida, R. F. de; Alvarenga, S. M.; Zambolim, L. 2017. Differential expression of molecular rust resistance components have distinctive profiles in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. *Eur J Plant Pathol.* 149, 543–561.
- Barros, V. A. 2016. Vias de sinalização mediadas por ácido salicílico e metiljasmonato e papel de GmbZIP89 em resposta à infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos contrastantes de soja. Dissertação de mestrado em Bioquímica Aplicada. UFV. Viçosa
- Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Eric W. Sayers, E. W. 2014. GenBank. *Nucleic Acids Research.* 42, 30–35.
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant*, 8(4), 521-539.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30 (15), 2114-2120.
- Boller, T., He, S. Y. 2010. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science.* 324 (5928), 742-744, 2010.
- Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., Ekengren, S. K., Collmer, A., Martin, G. B. 2010. Identification of *Nicotiana benthamiana* genes involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Molecular plant-microbe interactions.* 23 (6), 715–726.
- Chen, J., Mao, L., Lu, W., Ying, T., Luo, Z. 2016. Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. *Planta.* 243 (1), 183-197.

Chen, J. W., Romero, P., Uversky, V. N., Dunker, A.K. 2006. Conservation of intrinsic disorder in protein domains and families: II. functions of conserved disorder. *Journal of Proteome Research*. 5(4), 888-898.

Cheng, Q., Li, N., Dong, L., Zhang, D., Fan, S., Jiang, L., Wang, X., Xu, P., Zhang, S. 2015. Overexpression of Soybean Isoflavone Reductase (GmIFR) Enhances Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean. *Frontiers in Plant Science*. 23 (6).

Cherenkov, P., Novikova, D., Omelyanchuk, N., Levitsky, V., Grosse, I., Weijers, D., Mironova, V. 2018. Diversity of cis-regulatory elements associated with auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 69 (2), 329–339.

Correa-Galvis, V., Poschmann, G., Melzer, M., Stühler, K., Jahns, P. 2016. PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in *Arabidopsis*. *Nature Plants*.

De Sá, M. E., Conceição Lopes, M. J., Araújo Campos, M., Paiva, L. V, Dos Santos, R. M., Beneventi, M. A., Firmino, A. A., de Sá, M. F. 2012. Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne Javanica*. *Genetics and Molecular Biology*. 272–282.

Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P. R. 2000. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. *The Plant Cell*. 12, 279–290.

Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Estelle, M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. 435 (7041), 441–445.

Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., Wang, S. 2008. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase *gh3-8* suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *the Plant Cell Online*. 20 (1), 228-240.

Droge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W. P., Halkier, B. A., Loake, G. J., Doerner, P., Dixon, R. A., Chris Lamb, C. 1997. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *Plant Physiology*. 16 (4), 726-738.

Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., Bassi, R. 2002. Biochemical properties of the psbs subunit of photosystem ii either purified from chloroplast or recombinant. *The Journal Of Biological Chemistry*. 277 (25), 22750-22758.

Eulgem, T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Plant Physiology*. 10 (2).

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Cogill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J., Punta, M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*. 42, 222-230.

Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J., Wang, S. 2011. Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiology*. 155 (1) 589–602.

Gangadhar, B. H., Yu, J. W., Sajeesh, K., Park, S. W. 2014. A systematic exploration of high-temperature stress-responsive genes in potato using large-scale yeast functional screening. *Molecular Genetics and Genomics*. 289 (2) 185–201.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.

Graiferab, D., Karpovaab, G. 2015. Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes. *Biochimie*.

Gerotto, C., Franchin, C., Arrigoni, G., Morosinotto, T. 2015. In vivo identification of photosystem ii light harvesting complexes interacting with photosystem ii subunit S. *Plant Physiology*. 168, 1747–1761.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43 (1), 205-227.

González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., Bouarab, K. 2012. The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant cell*. 24, 1-17.

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D. S. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*. 40, 1178-1186.

Govind, G., Harshavardhan, V. T., Patricia, J. K., Dhanalakshmi, R., Senthil Kumar, M., Sreenivasulu, N., Udayakumar, M. 2009. Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Molecular Genetics and Genomics*. 281(6), 591–605.

Hagen, G., Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: gene, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49, 373-385.

Hartmann, E., Hartmann, R. K. 2003. The enigma of ribonuclease P Evolution. *Trends in Genetics*. 19 (10), 561-569.

Heinekamp, T., Strathmann, A., Kuhlmann, M., Froissard, M., Müller, A., Perrot-Rechenmann, C., Dröge-Laser, W. 2004. The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription. *The plant journal*. 38 (2), 298-309.

Hey, D., Ortega-Rodes, P., Fan, T., Schnurrer, F., Brings, L., Hedtke, B., Grimm, B. (2016). Transgenic tobacco lines expressing sense or antisense ferrochelatase 1 rna show modified ferrochelatase activity in roots and provide experimental evidence for dual localization of ferrochelatase 1. *Plant Cell Physiol*. 57(12), 2576–2585.

Hong, J.C., Nagao, R.T., Key, J.L. 1990. Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. A comparative analysis. *The Journal Of Biological Chemistry*. 265(5), 2470-2475.

Jahn, L., Mucha, S., Bergmann, S, Horn, C., Staswick, P., Steffens, B., Siemens, J., Ludwig-Müller, J. 2013. The clubroot pathogen (*Plasmodiophora brassicae*) influences auxin signaling to regulate auxin homeostasis in arabidopsis. 726-749.

Jakoby, M., Vicente-Carbajosa, J. 2002. bZIP transcription factors in arabidopsis.7(3), 106-111.

Jones, J. D. G., Dangl, J. L.2006. The plant immune system. *Nature*. 444 (7117), 323–329.

Jung, H. W., Hwang, B. K. 2000.Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular plant-microbe interactions*. 13 (1), 136-142.

Kadenbach, B., Hüttemann, M. 2015. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*. 24, 64-76.

Kaminaka, H., Nake, C., Epple, P., Dittgen, J., Schütze, K., Chaban, C., Holt, B. F., Merkle, T., Schäfer, E., Harter, K., Dangl, J.L. 2006. bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in arabidopsis following infection. *The EMBO Journal*. 25, 4400- 4411.

Kebrom, T. H., Chandler, P.M., Swain, S.M., King, R.W., Richards, R.A, Spielmeier, W. 2012. Inhibition of tiller bud outgrowth in the tin mutant of wheat is associated with precocious internode development. *Plant Physiology*.160 (1), 308-318.

Kebrom, T. H., Burson, B. L., Finlayson, S. A. 2006. Phytochrome B represses teosinte branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant physiology*.140 (3),1109–17.

Kebrom, T. H., Brutnell, T. P., Finlayson, S. A. 2010. Suppression of sorghum axillary bud outgrowth by shade, phyB and defoliation signalling pathways. *Plant, Cell and Environment*. 33 (1), 48-58.

Kidd, B. N., Kadoo, N.Y., Dombrecht, B., Tekeoglu, M., Gardiner, D.M., Thatcher, L.F., Aitken, E.A., Schenk, P.M., Manners, J.M., Kazan, K. 2011. Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root-infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions*. 24(6), 733-748.

Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N. R., Aebersold, R., Green, B. R., Vlahakis, S., Yocum, C. F., Pichersky, E. 1992. Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem. *Federation of European Biochemical Societies*. 314(1), 67-71

Kim, H. B., Lee, H., Oh, C. J., Lee, N. H., An, C. S. 2007. Expression of EuNOD-ARPI encoding auxin-repressed protein homolog is upregulated by auxin and localized to the fixation zone in root nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Molecules and cells*. 23 (1)115-121.

Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. 2000. Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression. *The Plant Cell*. 12, 2339-2350.

Kuhlmann, M., Horvay, K., Stathmann, A., Heinekamp, T., Fischer, U., Böttner, S., Dröge-Laser, W. 2003. The alpha-helical D1 domain of the bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1, and is essential for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *The Journal Of Biological Chemistry*. 278, 8786–8794.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7), 1870-1874.

Kuwano, Y., Olvera, J., Wool, I. G. 1991. The Primary Structure Of Rat Rirosomal Protein L38. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 175 (2), 551-555.

Langmead, B.; Trapnell, C.; Pop, M.; Salzberg, S. L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*. 10 (3).

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., A. Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21), 2947-2948.

Lee, S. C., Choi, H. W., Hwang, I.S., Choi, D.S., Hwang, B.K. 2006. Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, CAbZIP1, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta*. 224 (5), 1209-1225.

Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Oh, S.K., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G., Harn, C.H. (2002). PPI1: a novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. *Molecular plant-microbe interactions*. 15(6), 540-548..

Le, D. T., Aldrich, D.L., Valliyodan, B., Watanabe, Y., Ha, C. V., Nishiyama, R., Guttikonda, S. K., Quach, T.N., Gutierrez-Gonzalez, J.J., Tran, L.S., Nguyen, H.T. 2012. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. *PLoS One*. 7 (10).

Lee, J., Han, C. T., Hur, Y. 2013. Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, BrARP1 and BrDRM1. *Molecular Biology Reports*. 40 (1),197-209

Leyser, O. 2018. Auxin Signaling. *Plant Physiology*. 176, 465–479.

Li, X., Fan, S., Hu, W., Liu, G., Wei, Y., He, C., Shi, H. (2017). Two cassava basic leucine zipper (bZIP) transcription factors (MebZIP3 and MebZIP5) confer disease resistance against cassava bacterial blight. *Frontiers in Plant Science*.

Li, W., Wang, F., Wang, J., Fan, F., Zhu, J., Yang, J., Liu, F., Zhong, W. 2015. Overexpressing CYP71Z2 enhances resistance to bacterial blight by suppressing auxin biosynthesis in rice. *PLoS ONE*. 10(3), 1-17.

Lim, C. W., Baek, W., Lim, S., Han, S.W., Lee, S.C. 2015. expression and functional roles of the pepper pathogen-induced bzip transcription factor CabZIP2 in enhanced disease resistance to bacterial pathogen infection. *Molecular plant-microbe interactions*. 28 (7), 825-833.

Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez C., Jordá L., Parker, J., Molina, A. 2008. Repression of the auxin response pathway increases arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Molecular Plant*.1(3). 496-509.

Llorca, C. M., Potschin, M., Zentgraf, U. 2014.bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontier in plant science*.

Marreiros, B. C., Sena, F.V., Sousa, F.M., Batista, A.P., Pereira, M.M. 2016. Type II NADH:quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences. *Environmental Microbiology*. 18 (12), 4697–4709.

Mah, K. M., Rao Uppalapati, S. R., Tang, Y., Allen, S., Bin Shua, B.2012. Gene expression profiling of *Macrophomina phaseolina* infected *Medicago truncatula* roots reveals a role for auxin in plant tolerance against the charcoal rot pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 79, 21-30.

Mahajan, S., Tuteja, N. 2005.Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*. 444 (2), 139-58.

Maraschin, S., Memelink, J., Offringa, R. 2009. Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation.100-109.

Miranda, V. J., Coelho, R.R., Viana, A. A., de Oliveira, N. O. B., Carneiro, R. M., Rocha, T. L., de As, M. F., Frago, R.R. 2013. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. *BMC Research Notes*.

Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E., Nicolás, C. 2012. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Physiology*. 169 (6), 614-620.

Morgante, C. V., Brasileiro, A. C. M., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C. G., Fonseca, J. P., Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., Guimaraes, P. M. 2013. A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biology*. 40 (12), 1298-1309.

Mutka, A. M., Fawley S, Tsao T, Kunkel, B.N. 2013. Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. 746-754.

Nelson, D. L., Cox, M. M. 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed.

Nosek, L., Semchonok, D., Boekema, E. J., Ilík, P., Kouřil, R. 2017. Structural variability of plant photosystem II megacomplexes in thylakoid membranes. *The Plant Journal*. 89, 104-111.

Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., Casaretto, J.A. 2010. The transcription factor *SIAREB1* confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant Cell Environ*. 33, 2191–2208

Park, S., Han, K.H.(2003) An auxin-repressed gene (RpARP) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. *Tree physiology*. 23 (12), 815-23.

Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D.A., Tikkanen, M., Boekema, E.J., Aro, E.M., Jansson, S. 2014. The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins LHCB1 and lhcb2 play complementary roles during state transitions in *arabidopsis*. *The Plant Cell*. 26, 3646-3660.

Pieterse, C. M., Van der Does, D. Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 28, 489- 521.

Poupin, M. J., Greve, M., Carmona, V., Pinedo, I. 2016. A complex molecular interplay of auxin and ethylene signaling pathways is involved in *arabidopsis* growth promotion by *Burkholderia phytofirmans* PSJN. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1-16.

Proite, K., Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D.J, Moretzsohn, M.C, da Silva, F. R., Martins, N. F., Guimarães, P. M. 2007. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC plant biology*.

Qi, L., Yan, J., Li, Y., Jiang, H., Sun, J., Chen, Q., Li, H., Chu, J., Yan, C., Sun, X., Yu, Y., Li, C., Li, C.2012. *Arabidopsis thaliana* plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytologist*. 195 (4), 872-882.

Rae, G. M., David, K., Wood, M. 2013. The dormancy marker DRM1/ARP associated with dormancy but a broader role in planta. *Developmental Biology Journal*.

Rae, M, Uversky, V.N., David, K., Wood, M. 2014. DRM1 and DRM2 expression regulation: Potential role of splice variants in response to stress and environmental factors in *arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*. 289 (3), 317-332.

Ramos, P., Guajardo, J., Moya-León, M. A., Herrera, R. 2016. A differential distribution of auxin and flavonols in radiata pine stem seedlings exposed to inclination. *Tree Genetics and Genomes*. 12 (3).

R Development Core Team 2011 R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.13.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Reddy, A. S. N., Poovaiah, B. W. 1990. Molecular-Cloning and Sequencing of a Cdna for an Auxin-Repressed Messenger-Rna - Correlation between Fruit-Growth and Repression of the Auxin-Regulated Gene. *Plant Mol Biol*. 14 (2), 127-136.

Rivas, J. D., James Barber, J. 2004. Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynthesis Research*. 81, 329-343.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J. D. G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense : more than just jasmonate- salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol*. 49, 317-343.

Rodrigues, C.M., de Souza, A.A., Takita, M.A., Kishi, L.T., Machado, M.A. 2013. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC genomics*. 14(1).

Rotmistrovsky, K., Jang, W., Gregory D., Schuler, G. D. 2004. A web server for performing electronic PCR. *Nucleic Acids Research* *Nucleic Acids Res*. 32, 108-112.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniats, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor.

Salvianti, F., Bettini, P. P., Giordani, E., Sacchetti, P., Bellini, E., Buiatti, M. 2008. Identification by suppression subtractive hybridization of genes expressed in pear (*Pyrus* spp.) upon infestation with *Cacopsylla pyri* (Homoptera:Psyllidae). *Journal of Plant*

Physiology. 165(17), 1808-1816.

Schütze, K., Harter, K., Chaban, C. 2008. Post-translational regulation of plant bZIP factors. 247–255.

Seo, E., Choi, D. C. 2015. Functional studies of transcription factors involved in plant defenses in the genomics era. Briefings in Functional Genomics. 14(4), 260-267.

Shen, L., Liu, Z., Yang, S., Yang, T., Liang, J., Wen, J., Liu, Y., Li, J., Shi, L., Tang, Q., Shi, W., Hu, J., Liu, C., Zhang, Y., Lin, W., Wang, R., Yu, H., Mou, S., Hussain, A., Cheng, W., Cai, H., He, L., Guan, D., Wu, Y., He, S. 2016. Pepper CabZIP63 acts as a positive regulator during *Ralstonia solanacearum* or high temperature–high humidity challenge in a positive feedback loop with CaWRKY40. Journal of Experimental Botany. 67 (8), 2439-2451.

Shen, C., Yue, R., Sun, T., Zhang, L., Xu, L., Tie, S., Wang, H., Yang, Y. 2015. Genome-wide identification and expression analysis of auxin response factor gene family in *Medicago truncatula*. Frontiers in Plant Science. 24(6).

Shen, L., Li, F., Dong, W., Liu, W., Qian, Y., Yang, J., Wang, F., Wu, Y. 2017. Nicotiana benthamiana NbbZIP28, a possible regulator of unfolded protein response, plays a negative role in viral infection. Eur J Plant Pathol. 149, 831-843.

Shi, H., Zhang, Y., Chen, L. 2013. Two pear auxin-repressed protein genes, PpARP1 and PpARP2, are predominantly expressed in fruit and involved in response to salicylic acid signaling Plant Cell Tiss Organ Cult. 114, 279- 286.

Sievers F, Higgins, D. G. 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. Methods Mol Biol. 1079:105-16.

Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., and Dong X. 2009. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. Cell. 137, 860-872.

Song, J., Niu, Z., Li, Q., Bao, Y., Ma, X., Wang, H., Kong, L., Feng, D. 2015. Isolation and identification of differentially expressed genes from wheat in response to *Blumeria graminis f. sp. tritici* (bgt). *Plant Molecular Biology Reporter*. 33,1371-1380.

Souza, G. B. DE. 2014. Identificação De Proteínas Que Interagem Com O Fator De Transcrição Gmbzip105 De Soja (*Glycine max*). Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola. UFV. Viçosa.

Stafstrom, J.P., Ripley, B.D., Devitt, M.L, Drake, B. 1998. Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2. *Planta*. 205 (4), 547-552.

Steinley, D., 2006. K-means clustering: a half-century synthesis. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* Br J Math Stat Psychol.59,1-34.

Steiner, C., Bauer, J., Amrhein, N., Bucher, M. 2003. Two novel genes are differentially expressed during early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. *Biochimica Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*. 1625 (2), 123-133.

Su, J., Jia, B., Jia, S., Ye, Z. F., Heng, W., Zhu, L.W. 2015. Effect of plant growth regulators on calyx abscission, fruit quality, and auxin-repressed protein (ARP) gene expression in fruitlets of ‘Dangshansuli’ pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*.135-142.

Suga, M., Qin, X., Kuang, T., Shen, J.R. 2016. Structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-LHCI supercomplex Michihiro Suga. *Current Opinion in Structural Biology*. 39, 46-53.

Sugihara, K., Hanagata, N., Dubinsky, Z. , Baba, S., Karube, I (2000). Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant Cell Physiol*. 41(11), 1279-1285.

Sauer, M., Robert, S., Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin : simply complicated. *Journal of Experimental Botany*. 64(9):2565-77.

Song, J., Niu, Z., Li, Q., Bao, Y., Ma, X., Wang, H., Kong, L., Feng, D. 2014. Isolation and identification of differentially expressed genes from wheat in response to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt). *Plant Molecular Biology Reporter*. 33(5), 1371-1380.

Tak, H., Mhatre, M. (2013). Cloning and molecular characterization of a putative bZIP transcription factor VvbZIP23 from *Vitis vinifera*. *Protoplasma* . 250, 333–345.

Tanaka, E., Koga, H., Mori, M., Mori, M. 2011. Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. 530, 522–530.

Tao, X., Lichao, Ma., Zhang, Z., Liu, W., Zhipeng, L. (2018). Characterization of the complete chloroplast genome of alfalfa (*Medicago sativa*) (Leguminosae). *Gene Reports*. 6, 67–73.

Tatematsu, K., Ward, S., Leyser, O., Kamiya, Y., Nambara, E.(2005). Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 138 (2), 757-766.

Thomma, B. P. H. J., Nurnberger, T., Joosten, M. H. A. J. 2011. Of PAMPs and effectors : the blurred pti-eti dichotomy. 4-15.

Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K.P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., Rodríguez-Concepción, M., Halliday, K. J. 2014. The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLOS Genetics*. 10 (6).

Trapnell, C., Roberts, A. , Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. K., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J. L., Pachter, L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7 (3), 562–578.

Hwang, E.W., Kim, K.A., Park, S.C., Jeong, M.J, Byun, M.O, Kwon, H.B. 2005. Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. J Biosci. 657–667.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. M. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Research. 35, 71-74.

Verhage, A., Wees, S. C. M. Van., Pieterse, C. M. J. 2010. Plant Immunity: It ' s the Hormones Talking , But What Do They Say ? Plant Physiology. 154, 536-540.

Vriezen, W.H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., Mariani, C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. New Phytologist. 177 (1), 60-76.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., Dong, X.2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. Current Biology. 17(20), 1784-1790.

Wang, R., Yoshida, K., Toki, T., Sawada, T., Uechi, T., Okuno, Y., Sato-Otsubo, A., Kudo, K., Kamimaki, I., Kanezaki, R., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Terui, K., Sato, T., Iribe, Y., Ohga, S., Kuramitsu, M., Hamaguchi, I., Ohara, A., Hara, J., Goi, K., Matsubara, K., Koike, K., Ishiguro, A., Okamoto, Y., Watanabe, K., Kanno, H., Kojima, S., Miyano, S., Kenmochi, N., Ogawa, S., Ito, E 2015. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. British Journal of Haematology. 168, 854-864.

Wang, Z., Cheng, K., Wan, L., Yan, L., Jiang, H., Liu, S., Lei, Y., Liao, B. 2015. Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor gene family in six legume genomes. BMC Genomics. 10(16).

Wang, R., Yoshida,K.,Toki,T., Sawada,T., Uechi, T., Okuno,Y., Aiko Sato-Otsubo,A., Kudo, K., Kamimaki,I, Kanezaki, R., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Terui, K., Sato,T., Iribe,Y., Ohga, S., Kuramitsu, M., Hamaguchi,I., Ohara, A., Hara,J., Goi,K., Matsubara, K., Koike,K., Ishiguro,A., Okamoto,Y., Watanabe,K., Kanno, H., Kojima,S.,

Miyano, S. Kenmochi, N. Ogawa, S. Ito, E.2015. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*. 168, 854-864.

Wei, X., Su, X., Cao,P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X., Liu, Z. 2016. Structure of spinach photosystem II– LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature*.

Wen, Y., Lim, G. X., Wong, S. 2013. Profiling of genes related to cross protection and competition for nbtom1 by HLSV and TMV. *PLoS One* 8 (9), 1-12.

Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., Zickermann, V. 2016. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1857, 902-914.

Wood, M., Rae, G. M., Wu, R. M., Walton, E. F., Xue, B., Hellens, R. P, Uversky, V. N. (2013). Actinidia DRM1 - an intrinsically disordered protein whose mrna expression is inversely correlated with spring budbreak in kiwifruit. *PLoS One*.

Wu, L., Yu, M., Holowachuk, J., Sharp, A., Lydiate, D., Hegedus, D., Gruber, M.(2017).Evaluation of a *Brassica napus* auxin-repressed gene induced by flea beetle damage and *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *American Journal of Plant Sciences*. 8, 1921-1952.

Xiao, L. L., Xu, J., GuanQiao, Y., Li Luo, L. 2013. A wound-induced small polypeptide gene family is upregulated in soybean nodules. *Molecular Biology*. 58 (9), 1003-1009.

Xin, X.-F.; He, S. Y.2013. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 51 (1), 473-498.

Yamagata, H., Bowler, C. 1997. Molecular Cloning and Characterization of a cDNA Encoding Early Light-inducible Protein from Soybean (*Glycine max* L.). *Biosci. Biotech. Biochem* 61 (12), 2143-2144.

Yoshida, K., Wakamatsu, S., Sakuta, M. 2008. Characterization of SBZ1, a soybean bZIP protein that binds to the chalcone synthase gene promoter. *Plant Biotechnol.*25, 131-140.

Zhang, Y., Zhang, G., Xia, N., Wang, X., Huang, L., Kang, Z.2008. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology.*73, 88-94.

Zhang, C., Yang, C., Whitham, S. A., Hill, J. H. 2009. Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22,123-131.

Zhang, C., Bradshaw, J., Whitham, S. A., and Hill, J. H. 2010. The development of an efficient multipurpose Bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiol.*153, 52-65.

Zhang, N., Liu, D., Zheng, W., He, H., Ji, B., Han, Q., Ge, F., Chen, C. 2014. A bZIP transcription factor, LrbZIP1, is involved in *Lilium regale* Wilson defense responses against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *Genes and Genomics.* 36 (6), 789-798.

Zhang, J., Du, H., Chao, M., Yin, Z., Yang, H., Li, Y., Huang, F., Yu, D. 2016. Identification of two bZIP transcription factors interacting with the promoter of soybean rubisco activase gene (GmRCAa). *Frontiers in Plant Science.* 7 (628).

Zhao, Y., Li, C., Ge, J., Xu, M., Zhu, Q., Wu, T., Guo, A., Xie, J., Dong, H. 2014. Recessive mutation identifies auxin-repressed protein ARP1, which regulates growth and disease resistance in tobacco. *Molecular plant-microbe interactions.* 27(7), 638-54.

Zhao, D., Gong, S., Hao, Z., Meng, J., Tao, J. 2015. Quantitative proteomics analysis of herbaceous peony in response to paclobutrazol inhibition of lateral branching. *International Journal of Molecular Sciences.* 16 (10), 24332–24352.

Zhou, X. T., Wang, F., Ma, Y. P., Jia, L. J., Liu, N., Wang, H.Y., Zhao, P., Xia, G. X., Zhong, N. Q. (2018). Ectopic expression of SsPETE2, a plastocyanin from Suaeda salsa, improves plant tolerance to oxidative stress. *Plant Science*. 268, 1-10.

Zhou, Y., Zhang, D., An, J., Yin, H., Fang, S., Chu, J., Zhao, Y., Lia, J. 2017. TCP Transcription factors regulate shade avoidance via directly mediating the expression of both phytochrome interacting factors and auxin biosynthetic genes. *Plant Physiology Preview*. 176, 1850-1861.

Zhou, J. M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., and Klessig, D. F. 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the pr-1 gene required for induction by salicylic acid. *The American Phytopathological Society*. 13, 191-202.

Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 20 (1) 10-16.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Análise de qualidade dos dados brutos e montagem dos transcritos

Os dados brutos foram avaliados quanto a qualidade no programa FASTQC. Definiu-se para essas análises o valor de Phred= 15, como padrão de qualidade das bases. Nas figuras suplementares 1 e 2, estão representados a qualidade de cada base ao logo das *reads* do controle 2 (*lane 1 e 2*) e de bZIP105.2 (*lane 1 e 2*), respectivamente. O resultado está com boa qualidade, pois a maioria das bases das *reads* estão com valor de superior a Phred 30, onde a probabilidade de uma base estar incorreta é de 1 em 1000. O padrão de cores no fundo do gráfico representa um perfil de qualidade (verde, laranja e vermelho), onde verde são bases de muito boa qualidade, a região laranja de qualidade razoável e a faixa vermelha compreende bases de baixa qualidade. A maioria das bases das *reads* estão representadas na região verde.

Após avaliar a qualidade dos dados brutos, realizou-se a trimagem. Visto que o programa FASTQC permite apenas verificar a qualidade das bibliotecas, não permite a sua manipulação. Para a trimagem dos dados utilizou-se o programa Trimmomatic. A qualidade dos dados trimados das bibliotecas controle 2 e de bZIP105.2 está representado na figura suplementar 3. A remoção de *reads* ou base de baixa qualidade é muito importante, pois se essas forem mantidas no conjunto de dados pode interferir na qualidade final dos resultados.

Nas tabelas suplementares 1 e 2 estão representados a estatística básica do FASTQC de dados não triamados e trimados do controle.2 e do bZIP105.2, respectivamente. No controle.2 após a trimagem tem-se um total de *reads* de 53707548, enquanto no bZIP105.2 tem-se 76801774 de *reads*. Pode-se observar em ambos os casos, que ocorre uma redução no número total de *reads*, isso é devido a remoção de bases e/ou *reads* de baixa qualidade.

Tabela suplementar 1 - Estatísticas básicas geradas por FastQC da biblioteca Controle 2.

Controle 2	Não trimados		Trimados
	Lane 1	Lane 2	
Total de Reads	27844976	27647594	53707548
Comprimento das reads	35-101	35-101	25-101
%CG	50	50	53

Tabela suplementar 2 - Estatísticas básicas geradas por FastQC da biblioteca bZIP105. 2.

bZIP105. 2	Não trimados		Trimados
	Lane 1	Lane 2	
Total de Reads	40512269	40439620	76801774
Comprimento das reads	35-101	35-101	25-101
%CG	53	53	53

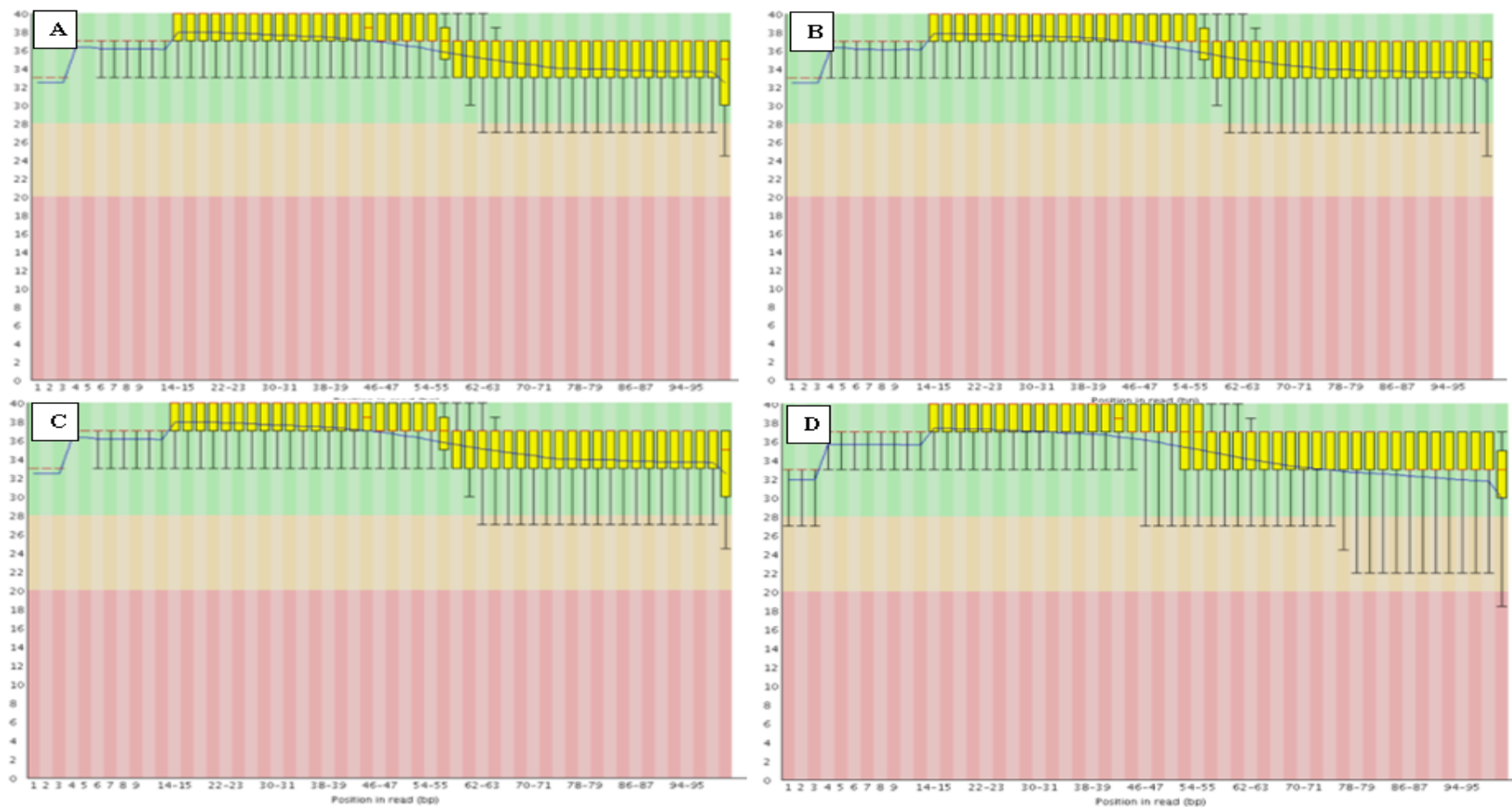


Figura suplementar 1: Qualidade dos dados brutos da biblioteca do controle 2. Qualidade das *reads* por base da biblioteca do controle 2, geradas pelo FastQC. No eixo x, tem-se a representação das bases (pb) ao longo das *reads*, e no eixo y, o valor da qualidade em valores de Phred. A linha azul representa qualidade média. A e B) Tem-se a lane 1 do controle 2; C e D) Tem-se a lane 2 do controle. 2.

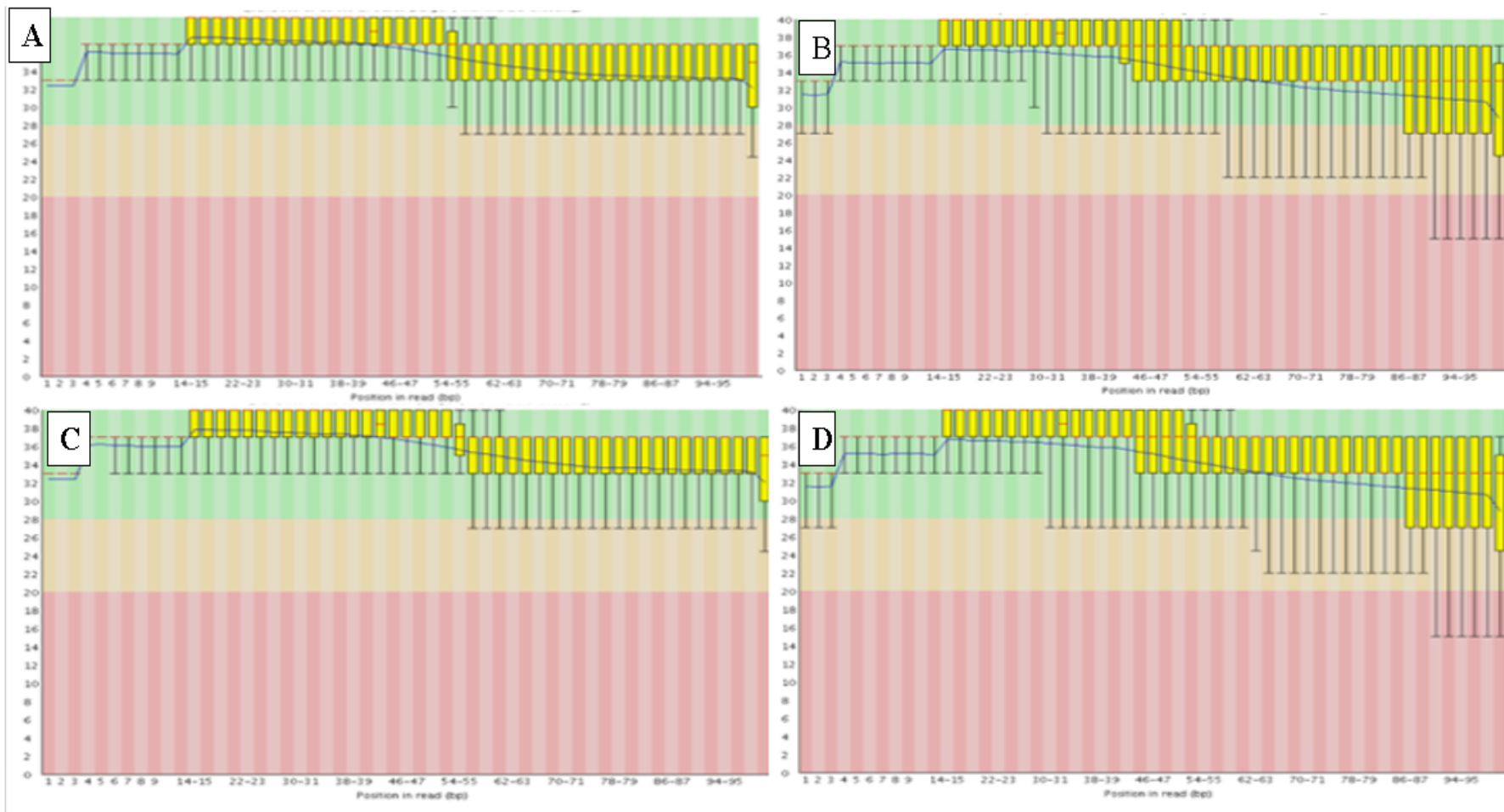


Figura suplementar 2: Qualidade dos dados brutos da biblioteca bZIP105.2. Qualidade das *reads* por base da biblioteca do bZIP105.2 geradas pelo FastQC. No eixo x, tem-se a representação das bases (pb) ao longo das *reads*, e no eixo y, o valor da qualidade em valores de Phred. A e B) Tem-se a lane 1 da biblioteca bZIP105.2; C e D) Tem-se a lane 2 biblioteca bZIP105.2.

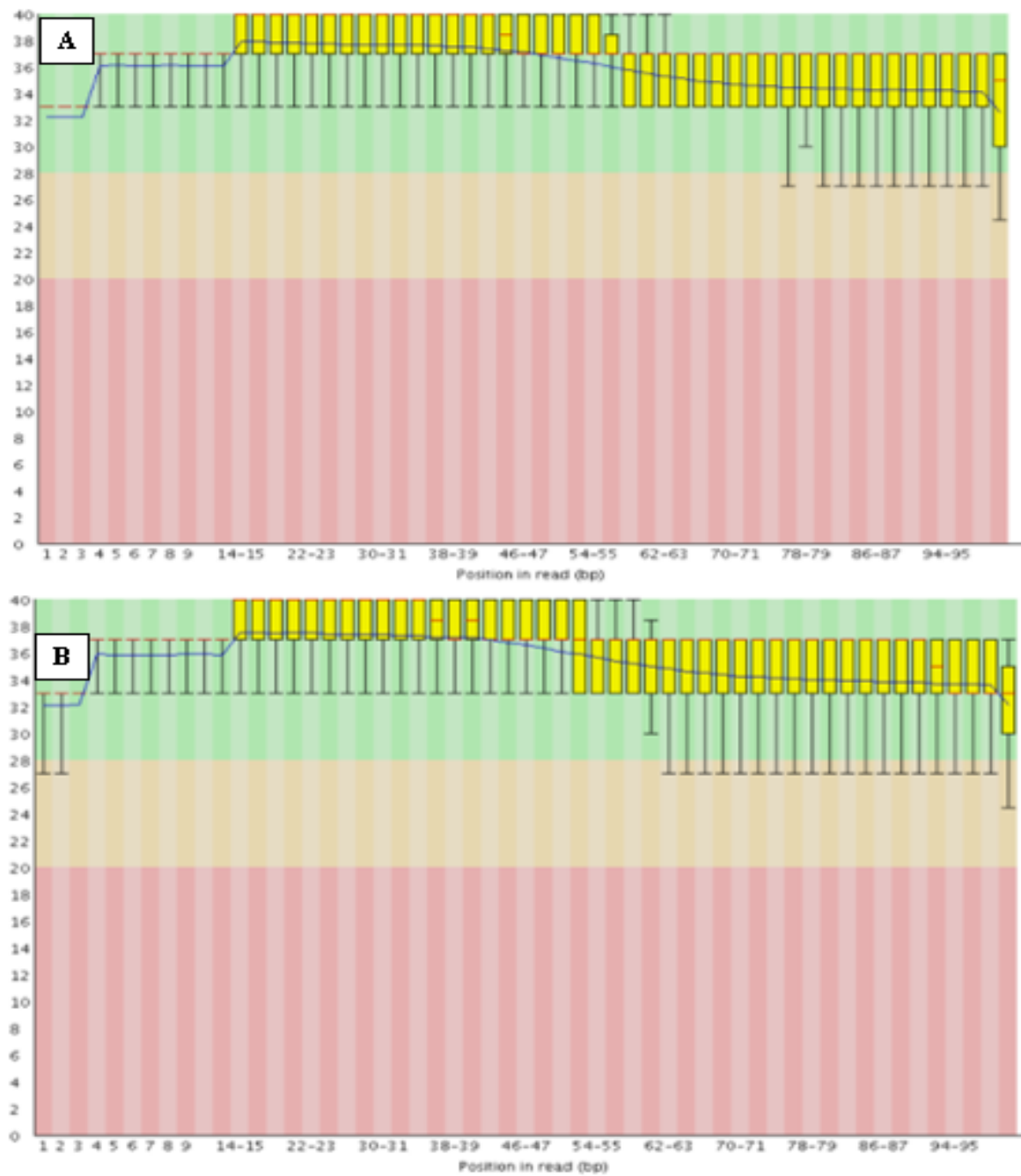


Figura suplementar 3: Qualidade dos dados PE trimados gerados pelo FASTQC. No eixo x, tem-se a representação das bases (pb) ao longo das *reads*, e no eixo y, o valor da qualidade em valores de Phred. A) Qualidade das *reads* por base da biblioteca do Controle.2. B) Qualidade das *reads* por base d3a biblioteca do bZIP105.2.

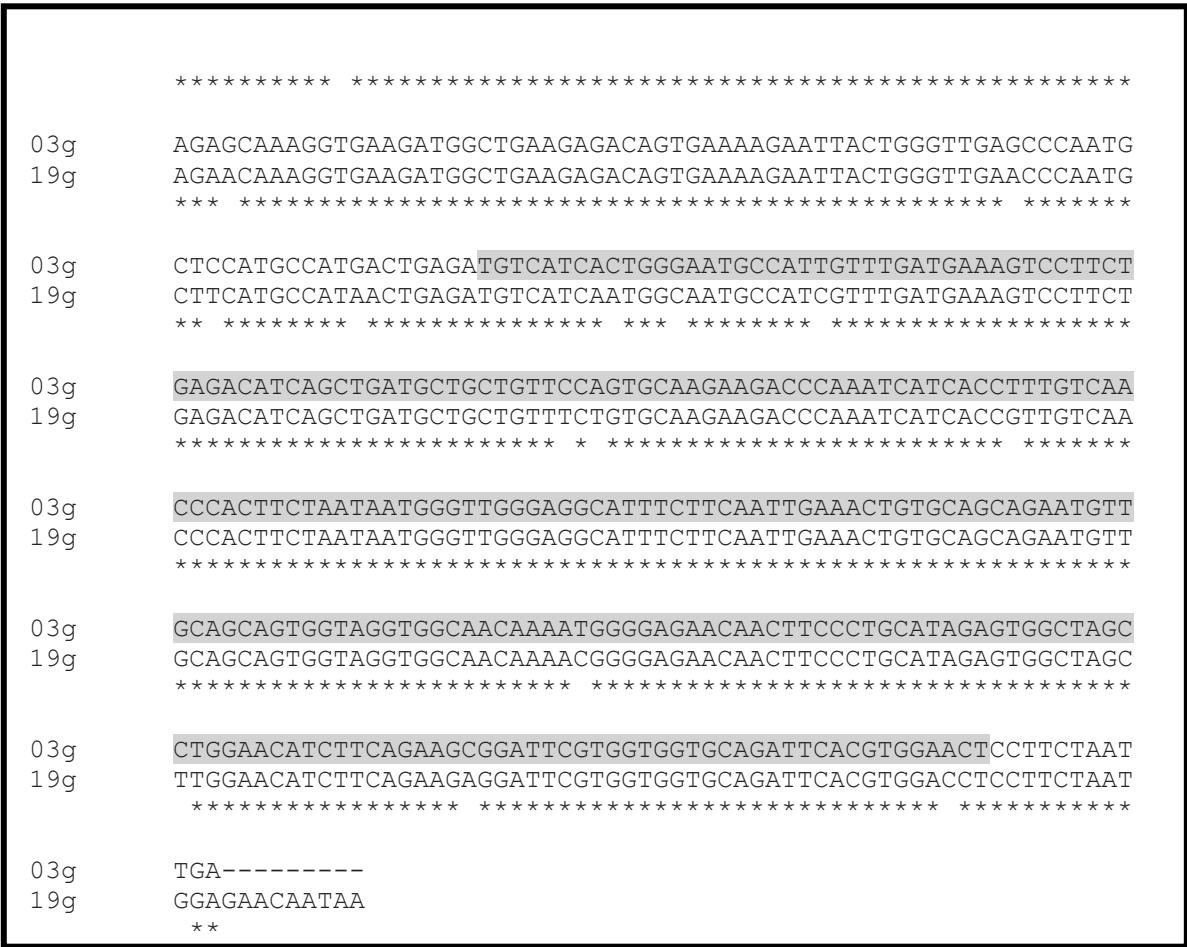


Figura suplementar 4: Alinhamento das CDS dos genes Glyma.19G244800 e Glyma.03G247100 utilizando o programa Clustal W. As estrelas representam regiões idênticas nas duas sequências. Em amarelo está representado as regiões onde alinham os oligonucleotídeos de qRT-PCR. A região cinza é a região clonada no vetor de silenciamento.

```

15g      ATGGTTCTGCTAGAGAAGCTCTGGGATGATGTTGTGGCTGGCCCTCAACCTGAGCGTGGC
13g      ATGGTTCTGCTAGAGAAGCTCTGGGATGACGTTGTTGCTGGCCCTCAACCTGAGCGTGGC
          *****
15g      CTTGGCAAGCTCAGAAAACCTCACCACCCTCAAAACTATTGATGAAGGAGAAAGTAGCAAG
13g      CTTGGCAAGCTCAGAAAACCTCACCACCCTCAAAACTATTGATGAAGGAGACAGTAGCAAG
          *****
15g      CTGCAGAAGACGTTGTCGATGCCGTCGACACCAACAACCCCGATGACTCCGACGACTCCA
13g      CTGCAGAAGACGTTGTCGATGCCGTCGACACCGACAATCCCGATGACTCCACGACTCCA
          *****
15g      ACGACACCGGGATCGGCCCGTAAAGCTGACAACGTTTGGAGGAGCGTCTTCCATCCTGGG
13g      ACGACACCGGGATCCGCGCGTAAAGCTGACAACGTTTGGAGGAGCGTCTTCCATCCTGGG
          *****
15g      AGCAACTCCGCCACAAAGACCATCGGTGCTCAGATGTTTGACAAACCACTTCCCAACACT
13g      AGCAACTCCGCCACAAAGACCATCGGTGCTCAGATGTTTGACAAACCACTTCCCAACACT
          *****
15g      CCCACTGTCTATGACTGGTATATTATTGTTGTTGTTGCTACGTTCTTTTCCCATGATAAAC
13g      CCCACTGTCTACGACTGGCTGTACAGTGGGGAGACCAGAAGCAGGCACCGCTGA-----
          *****
15g      TAA
13g      ---

```

Figura suplementar 5: Alinhamento das CDS dos genes Glyma.15G076500 (15g) e Glyma.13G056000 (13g) utilizando o programa Clustal W. As estrelas representam regiões idênticas nas duas sequências. Em amarelo está representado as regiões onde alinham os oligonucleotídeos de qRT-PCR. A região cinza é a região clonada no vetor de silenciamento.