

**O PAPEL DAS UREASES DE SOJA (*Glycine max*  
(L.) Merr.) NO DESENVOLVIMENTO DA PLANTA  
E NA PROTEÇÃO CONTRA NEMATOIDE  
CAUSADOR DE GALHA**

Ciliana Rechenmacher



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

CILIANA RECHENMACHER

O PAPEL DAS UREASES DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) NO  
DESENVOLVIMENTO DA PLANTA E NA PROTEÇÃO CONTRA  
NEMATOIDE CAUSADOR DE GALHA

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para obtenção do título de doutor em  
Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini

Co-orientadora: Dra. Beatriz Wiebke-Strohm

Porto Alegre

2016

CILIANA RECHENMACHER

O PAPEL DAS UREASES DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) NO  
DESENVOLVIMENTO DA PLANTA E NA PROTEÇÃO CONTRA  
NEMATOIDE CAUSADOR DE GALHA

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para obtenção do título de doutor em  
Genética e Biologia Molecular

Dezembro de 2016

Banca Examinadora

---

Componente da Banca Examinadora - Instituição a que pertence

---

Componente da Banca Examinadora - Instituição a que pertence

---

Componente da Banca Examinadora - Instituição a que pertence

## **INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de (i) Genética Molecular Vegetal, (ii) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e (iii) Embrapa soja- laboratório de Biotecnologia Vegetal

Recebeu apoio financeiro da PRONEX-FAPERGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?”*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Helena Bodanese-Zanettini, um exemplo de profissional, eu sou eternamente grata por todo o conhecimento passado, pela forma otimista e confiante com que me orientou, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal. Agradeço pela oportunidade que me proporcionou e pela querida acolhida em seu local de trabalho.

A Beatriz que foi minha segunda orientadora além de uma grande amiga, muito obrigada por toda a contribuição para este trabalho com as ureases, sendo responsável por boa parte do conhecimento prático e teórico que adquiri. Obrigada por todo apoio que sempre me deste, pelos conselhos nas nossas idas e vindas para Porto Alegre. Sendo sempre minha inspiração.

A toda equipe da soja em especial aos colegas Beatriz, Luisa, Mariana, Giulia, Caroline e Leticia.

A Mariana que chegou em nossa equipe em um momento de muitas atividades em nosso laboratório e contribui de uma forma importantíssima para o desenvolvimento deste trabalho e de tantos outros. Muito obrigada por toda ajuda e pela amizade que desenvolvemos.

A Luisa agradeço por toda a ajuda e pela amizade, somos uma boa equipe cada uma trabalhando da sua maneira conseguimos atingir nossos objetivos.

A Ana Korbes pela grande amizade e pelas palavras de incentivo e por muitas dúvidas esclarecidas.

À Dra. Célia Carlini e sua equipe do Laboratório de Proteínas Tóxicas, pelo incentivo com o trabalho das ureases e pelas contribuições nos manuscritos.

Ao Dr. Joe Polacco pela importantíssima contribuição para a conclusão do manuscrito

À Dra. Francismar C. Marcelino-Guimarães da Embrapa soja e toda a sua equipe do laboratório de biotecnologia vegetal pelo acolhimento e por toda ajuda que me forneceram para a realização dos meus experimentos e pelo aprendizado que adquiri.

A todos do laboratório de genética vegetal pela amizade, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de descontração.

A toda equipe do nosso laboratório, pela amizade, por tornarem nosso ambiente de trabalho em um local agradável.

Ao Elmo pela constante atenção e dedicação.

Às fontes financiadoras PRONEX-FAPERGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradeço a minha família, minha mãe Vera Lucia e ao meu irmão Samuel por sempre me incentivarem, e por terem sido pacientes comigo durante todo esse período. Principalmente minha mãe que sempre me ajudou da melhor forma possível para que eu continuasse meus estudos.

Aos meus novos amigos da corrida, aonde eu sempre recarrego minhas energias, obrigada pelos momentos de alegria.

Aos meus companheiros de viagens diárias até Porto Alegre, pela parceria e por terem tornado estes momentos mais agradáveis.

A todos os amigos, pelo apoio, pelas palavras de incentivo.

A todos os professores, que contribuíram para minha formação.

Muito obrigada a todos vocês! Cada um contribui de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

## Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo I - Introdução Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Soja.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Transformação genética.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Ureases.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 Ureases em Plantas .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Papel das Ureases .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.1 Papel das Ureases em relação a Atividade ureolítica .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.2 Papel de defesa das ureases .....</b>	<b>30</b>
<b>1.6 Efeito da expressão de genes que codificam ureases de soja .....</b>	<b>31</b>
<b>1.7 Peptideo recombinante derivado de urease de soja.....</b>	<b>33</b>
<b>1.8 Justificativa.....</b>	<b>33</b>
<b>1.9 Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>1.9.1 Objetivos gerais.....</b>	<b>34</b>
<b>1.9.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo II - Effect of soybean ureases on seed germination and plant development .....</b>	<b>36</b>

<b>Capítulo III - Soyuretox, a Urease-derived Peptide, for Plant Protection against Root-knot Nematodes .....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo IV - Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1 Análise das plantas transgênicas com o gene <i>Eu4</i> co-suprimido .....</b>	<b>93</b>
<b>4.2 Transformação de soja mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> e bombardeamento de partículas .....</b>	<b>94</b>
<b>4.3 Análise da toxicidade do peptídeo Soyuretox contra o ataque do fitonematóide <i>M. javanica</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>Referências Bibliográficas dos Capítulos I e IV .....</b>	<b>97</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

*bar*: gene marcador que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio

bp: pares de bases do DNA

CaMV: do inglês *Cauliflower mosaic virus*, vírus do mosaico da couve-flor

cDNA: DNA complementar

cv: cultivar

DNA: Acido desoxirribonucléico

*EgfpER*: gene repórter que codifica altos níveis da proteína fluorescente verde

FR: fator reprodutivo

GFP: do inglês *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde

GS1: Glutamina sintetase citosólica

HNO<sub>3</sub>: ácido nítrico.

*hpt*: gene marcador que codifica a higromicina fosfotransferase

JBU: urease majoritária da semente de *Canavalia ensiformis*

JBUREII: urease secundária de *Canavalia ensiformis*

J2: segundo estágio juvenil

J3: terceiro estágio juvenil

J4: quarto estágio juvenil

kb: Kilobases

kDa: kiloDaltons

N: nitrogênio

NH<sub>4</sub>: amônia

NG: sementes que não germinaram

NT: não transgênica

ORF: do inglês *open reading frame*

PCR: do inglês *polymerase chain reaction*

Pi: população inicial

pH: potencial de hidrogênio

P35S: promotor do gene 35S do CaMV

RNA: ácido Desoxirribonucleico

RT-qPCR: transcrição reversa associada a PCR quantitativa em tempo real

T<sub>0</sub>: plantas transgênicas recuperadas da cultura *in vitro*

T<sub>1</sub>: progênie das plantas transgênicas recuperadas da cultura *in vitro*

T<sub>2</sub> progênie das plantas transgênicas da progênie T<sub>1</sub>

T<sub>3</sub> progênie das plantas transgênicas da progênie T<sub>2</sub>

T35S: terminador do gene 35S do CaMV

UTR: região não-traduzida das bordas do mRNA

VE: estágio fenológico da planta correspondente ao desenvolvimento vegetativo com os cotilédones acima da superfície do solo

VC: estágio fenológico da planta correspondente ao desenvolvimento vegetativo com os cotilédones completamente abertos.

V1: estágio fenológico da planta correspondente ao desenvolvimento vegetativo com as folhas unifolioladas completamente desenvolvidas

V2: estágio fenológico da planta correspondente ao desenvolvimento vegetativo com a primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida

V3: estágio fenológico da planta correspondente ao desenvolvimento vegetativo com a segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida.

## RESUMO

Ureases são tradicionalmente conhecidas por catalisar a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono. Em soja, três isoformas de urease foram descritas: 1) urease ubíqua, codificada pelo gene *Eu4*; 2) urease embrião específica, codificada pelo gene *Eu1*; 3) urease SBU-III, codificada por *Eu5*. O nitrogênio (N) é o nutriente mais limitante para o crescimento e desenvolvimento da planta. Portanto, mecanismos eficientes para capturar o N nas suas diversas formas, e realocá-lo, são necessários para otimizar o uso do nutriente pela planta. O produto N da atividade da urease - a amônia é incorporada em compostos orgânicos, principalmente, pela atividade da glutamina sintetase. Assim, a urease está envolvida na remobilização do N, bem como na assimilação do N primário. Um estudo anterior foi realizado por nossa equipe com o objetivo de superexpressar o gene *Eu4* em plantas de soja. Inesperadamente, as plantas transgênicas exibiram co-supressão do transgene *Eu4* e de todos os genes endógenos que codificam as isoformas de urease. Foi verificada também, uma diminuição da atividade ureolítica. Visando determinar o papel das ureases no desenvolvimento da soja, foram comparadas plantas transgênicas co-suprimidas, plantas mutantes e seus respectivos controles. O desenvolvimento das plantas foi avaliado 7, 14, 21 e 30 dias após a semeadura. As plantas co-suprimidas apresentaram um atraso no desenvolvimento durante o primeiro mês após a germinação. Um desenvolvimento mais lento foi observado para o duplo mutante *eul-a/eu4-* e o mutante simples *eu3-a* (este gene codifica uma proteína acessória inativa). A absorção de N nas plantas transgênicas foi significativamente menor do que a das plantas não transgênicas. Entre os mutantes, *eu3-a* apresentou o menor e *eul-a* o maior conteúdo de N. Um número significativamente menor de sementes foi obtido para as plantas transgênicas. Em conjunto estes resultados indicam que o conteúdo da urease ou da atividade ureolítica desempenham um papel importante no desenvolvimento da planta. A soja (*Glycine max*) é afetada por vários estresses bióticos e abióticos, que limitam a distribuição geográfica das culturas e levam a reduções significativas de crescimento e produtividade. No Brasil, as doenças causadas por nematoides são um dos estresses bióticos mais prejudiciais para a soja. As principais espécies encontradas no Brasil são *Meloidogyne spp.* (formadores de galhas), *Heterodera glycines* (cisto), *Pratylenchus brachyurus* (lesões radiculares) e *Rotylenchulus reniformis* (reniforme). Nematoides formadores de galhas e de cisto (nematóides sedentários), os patógenos mais prejudiciais à soja, são muito difíceis de controlar. Neste estudo, foi identificado um peptídeo derivado

da urease de soja (nomeado Soyuretox), que exerce efeito tóxico contra fitonematoides formadores de galhas (*M. javanica*). Soyuretox foi expresso em raízes de plantas compostas plantas transgênicas estáveis de soja. Raízes de plantas compostas e plantas transgênicas estáveis superexpressando Soyuretox exibiram uma redução significativa (50% e 37.5%, respectivamente) no número médio de nematoides e ovos, quando comparado com raízes não transformadas, 45 dias após a inoculação. Este é o primeiro relato de resistência a nematóides causada por um peptídeo derivado de uma urease. Soyuretox pode representar uma ferramenta útil bem como uma nova e eficiente alternativa para o controle de pragas e doenças em culturas economicamente importantes.

## ABSTRACT

Ureases are traditionally known for catalyzing the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. In soybean, three urease isoforms have been described: 1) ubiquitous urease, encoded by the *Eu4* gene; 2) embryo-specific urease, encoded by *Eu1* gene; 3) SBU-III urease, encoded by *Eu5*. Nitrogen (N) is the most limiting nutrient for plant growth and development. Therefore efficient mechanisms both to take up N in its various forms, and to reallocate it, are necessary for optimal N use efficiency. The N product of urease activity- ammonia- is incorporated into organic compounds mainly by glutamine synthase activity. Thus, urease is involved in N remobilization, as well as in primary N assimilation. A previous study was performed by our team aiming to overexpress *Eu4* gene in soybean plants. Unexpectedly, the transgenic plants exhibited endogenous (for all three genes) and introduced *Eu4* transgene co-suppression and decreased ureolytic activity. Here, we sought to determine urease roles in soybean development by silencing all urease isoforms. Analyses were performed using transgenic co-suppressed and mutant plants. Plant development was evaluated 7, 14, 21 and 30 days after sowing. The co-suppressed plants presented a developmental delay during the first month after germination when compared with control. A slower development was observed for the double *eu1-a/eu4-a* mutant and the *eu3-a* (this gene codify an inactive accessory protein) single mutant. The N uptake in transgenic plants was significantly lower than that captured by non-transgenic plants. Among mutants, *eu3-a* presented the lowest and *eu1-a* the highest N content. A significantly lower number of seeds was obtained for transgenic plants. Altogether, these results indicate that the urease content and/or ureolytic activity play an important role in plant development.

Soybeans (*Glycine max*) are affected by several abiotic and biotic stresses that limit the geographical distribution of cultures and lead to significant reductions in growth and productivity. In Brazil, the diseases caused by nematodes are one of the most damaging biotic stresses for soybeans.. The main species found in Brazil are *Meloidogyne spp.* (root-knot), *Heterodera glycines* (cyst), *Pratylenchus brachyurus* (root lesion) and *Rotylenchulus reniformis* (reniform). Root-knot and cyst nematodes (sedentary nematodes), the most damaging soybean pathogens, are very difficult to control. In this study, we identified a soybean urease-derived peptide (named Soyuretox) that exerts toxic effects against the root-knot phytonematode (*M. javanica*). Soyuretox was expressed in

soybean roots of composite plants and complete stable transgenic plants. Roots of composite plants and stable transgenic plants overexpressing Soyuretox exhibited a significant reduction (50% and 37.5%, respectively) in the average number of nematodes and eggs when compared with non-transformed roots, 45 days after inoculation. This is the first report of nematode resistance caused by a urease-derived peptide. Soyuretox may represent a useful tool as a new and efficient alternative to control pests and diseases in economically important crops.

**Capítulo I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

---

## 1 Introdução Geral

### 1.1 Soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merri.] é uma espécie de planta diploide ( $2n=40$ ), pertencente à família Fabaceae (Leguminosa), de autofecundação e com ciclo de vida anual. O seu surgimento como cultura alimentar ocorreu no nordeste da China em torno de 1700 – 1100 a.C., sendo uma das mais antigas plantas cultivadas (Hartman et al. 2011). No Brasil o seu plantio em larga escala só teve início em 1960 (Reetz et al. 2008).

A semente da soja composta por 38% de proteína e 18% de óleo. Essas características fazem da soja um dos principais componentes da ração animal e uma importante matéria prima para produção de biocombustíveis. Seus produtos são também bastante utilizados na alimentação humana e na produção de cosméticos (Liu, 2008). O consumo mundial da soja vem aumentando gradativamente nos últimos anos (Liu, 2008; CONAB, 2016).

A oleaginosa é uma cultura de grande importância para o agronegócio do nosso país, sendo responsável por grande parte do aumento das exportações (Liu, 2008; CONAB, 2016). Segundo os dados do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), na safra mundial de soja em grãos 2015/2016 os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina foram responsáveis por 31,95%, 31,82% e 17,61% respectivamente, o que representa 81,37% de toda a produção mundial do grão (CONAB, 2016). De acordo com os dados da CONAB e USDA (2016), na safra de 2015/16 foram produzidas 312.362 milhões de toneladas de soja no mundo. O Brasil aparece como o segundo maior produtor mundial de soja, com 95.631 milhões de toneladas na safra 2015/16, atrás apenas dos EUA. Nos últimos 10 anos obteve-se um incremento de 74,8% no nosso país, como resultado de um aumento de 40,4% na área plantada e de 24,5% na produtividade. Os estados que apresentaram maior produção no período de 2014/15 foram: Mato Grosso com 29,2%, Paraná com 17,8%, Rio Grande do Sul com 15,4% e Goiás com 9,1% da produção. Estima-se para a safra 2016/17, uma produção mundial aproximada de 324 milhões de toneladas e que o Brasil continue sendo o segundo maior produtor, com 103 milhões de toneladas de soja em grãos, ou seja, 6,19% maior que na safra 2015/16 (CONAB, 2016).

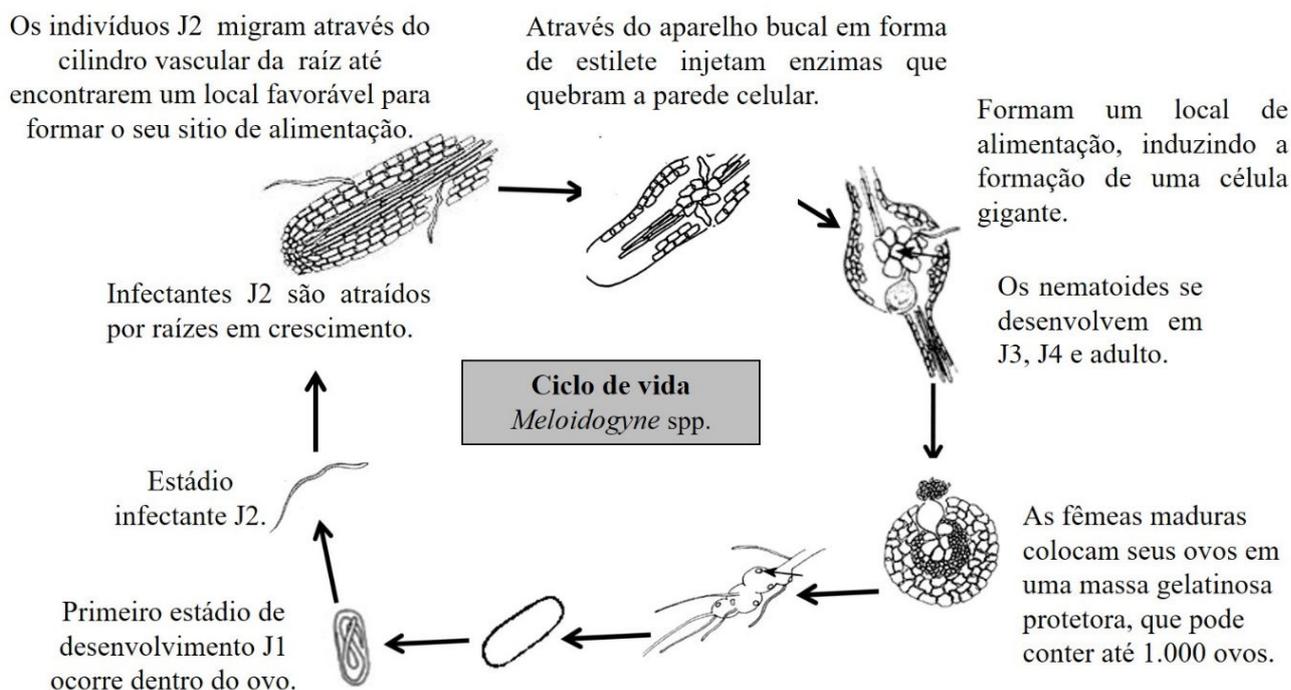
Devido a sua importância, a soja vem sendo alvo de constantes esforços para o seu melhoramento genético. Tal fato levou a comunidade científica internacional que trabalha com leguminosas a recomendar a soja como planta modelo para estudos genéticos e moleculares (Gepts et al. 2005). A soja teve seu genoma completamente sequenciado em 2010 (Schmutz et al. 2010), o que tem permitido grandes avanços em estudos de genômica funcional e engenharia genética, que representam ferramentas importantes para estudos básicos, visando contribuir para os programas de melhoramento desta cultura.

Apesar do cenário mundial da soja ser bastante positivo, principalmente para o Brasil, diversos estresses bióticos (fungos, bactérias, nematoides, vírus, ervas daninhas, insetos) e abióticos (seca, alagamento, temperaturas extremas, salinidade, toxicidade de minerais) limitam a distribuição geográfica das culturas e acarretam reduções significativas no desenvolvimento das plantas e na produtividade (Dita et al. 2006). Um dos principais limites impostos pelo ambiente é a suscetibilidade das plantas a inúmeras doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. A cada ano a severidade de certas doenças vem aumentando devido à expansão da área agrícola e a utilização de cultivares com pouca variabilidade genética (Barros & Borges, 2007; Barros, 2009).

Os nematoides são parasitas que representam uma ameaça significativa para a produção global de alimentos, com perdas anuais estimadas em mais de 80 bilhões de dólares (Nicol et al. 2011). No Brasil diferentes espécies de nematoides atacam as plantações de soja. Dentre estas espécies de fitonematoides destacam-se: formadores de galhas (*Meloidogyne spp.*), de cisto (*Heterodera glycines*), de lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (Pazhavarical, 2009; Dias et al. 2010). Os fitonematoides formadores de galhas apresentam vida sedentária e são de difícil controle pois estabelecem locais de alimentação complexos dentro de suas plantas hospedeiras (Jones et al. 2013). Plantas que são infestadas por esses parasitas apresentam drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas, como atraso no crescimento, clorose e baixo rendimento, além do favorecimento da instalação de outros parasitas, como fungos, vírus e bactérias (Bird & Kaloshian, 2003; Williamson et al. 2003).

Os fitonematoides de galhas possuem ampla distribuição geográfica e uma grande disseminação, além de parasitarem quase todas as espécies de plantas vasculares (Sasser, 1979; Moens et al. 2009). Esses fitonematoides no seu estágio juvenil (J2, fase infectante)

são atraídos pelas raízes em crescimento. Através do aparelho bucal em forma de estilete os indivíduos J2 injetam enzimas celulolíticas e proteolíticas que quebram a parede celular, o que auxilia na sua penetração (Moens et al. 2009). Os fitonematoides migram através do cilindro vascular da raiz até encontrarem um local favorável para o seu sítio de alimentação, induzindo a formação de um conjunto de células gigantes, cuja função é a produção de alimentos para os parasitas. Devido à multiplicação dessas células, ocorre um aumento da estrutura das raízes, formando as galhas (Fuller et al. 2008). Os estádios subsequentes de desenvolvimento dos nematoides formadores de galhas são J3, J4 e, finalmente, adulto. Em condições ambientais favoráveis, ocorre a formação das fêmeas que apresentam vida sedentária e, em condições adversas, os machos são formados. Estes deixam a raiz em direção ao solo onde permanecem até sua morte. Os machos não são necessários para completar o ciclo de vida dos nematoides. Ovos viáveis podem ser produzidos pelas fêmeas sem que ocorra a fertilização, ou seja, a reprodução ocorre por partenogênese (Chitwood & Perry, 2009). As fêmeas podem depositar até 1.000 ovos, os quais permanecem em uma massa gelatinosa protetora incorporada nas galhas ou na superfície da raiz (Figura 1) (Moens et al. 2009).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. Os estádios de desenvolvimento são divididos em ovo, juvenis: J1(dentro do ovo), J2, J3, J4 e fase adulta. A fêmea permanece na planta onde ovopositam em uma massa gelatinosa protetora, que pode conter até 1.000 ovos. Os ovos são liberados e o ciclo inicia-se novamente. As fêmeas produzem ovos por dois ou três meses e, após este período, podem viver por mais algum tempo naquele local. (Adaptado a partir de Proite, 2007).

Considerando que o prejuízo causado por nematoides em plantas de soja e que o uso dos nematicidas é extremamente prejudicial ao ambiente e não totalmente eficaz no controle desses patógenos (Jeyaratnam et al. 1990; Urwin et al. 2000; COODETEC, 2002; Embrapa Soja, 2016), destaca-se a importância da identificação e do desenvolvimento de cultivares resistentes. Nesse contexto, estratégias biotecnológicas apresentam-se como ferramentas promissoras, destacando-se a prospecção de genes que irão contribuir para a produção de variedades mais resistentes.

## 1.2 Transformação genética

A transformação genética é descrita como a introdução de um DNA recombinante na célula da planta, usando técnicas de engenharia genética. A condição básica para a

introdução de genes exógenos em plantas ou para estudos funcionais de genes é o desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação, que atendam as características de cada espécie (Wiebke-Strohm et al. 2012). Dois diferentes sistemas têm sido desenvolvidos para regenerar plantas *in vitro*: a organogênese de tecido meristemático e a embriogênese somática (Somers et al. 2003). A organogênese é uma via de regeneração que utiliza tecidos oriundos de meristemas, nódulos cotiledonares ou folhas primárias imaturas (Thorpe, 1994). A embriogênese somática consiste na obtenção de células totipotentes a partir de tecidos somáticos diferenciados (Sato et al. 1993). Independentemente do método de transformação utilizado, embriões somáticos secundários (originários a partir de outros embriões somáticos que tendem a ter origem unicelular) são com frequência utilizados para a transformação de soja (Finer 1988; Finer & McMullen, 1991; Merkle et al. 1995).

Para a transformação estável de vegetais dois métodos têm sido utilizados com sucesso: bombardeamento de partículas (Sanford, 1988; Droste et al. 2002; Homrich et al. 2012; Wiebke-Strohm et al. 2012) e o sistema *Agrobacterium* (Horsch et al. 1985; Wang & Xu, 2008; Wiebke-Strohm et al. 2011). O método de bombardeamento de partículas consiste em introduzir o DNA adsorvido à superfície de micropartículas, que podem ser de ouro ou tungstênio (pesadas e inertes para a célula vegetal), num tecido alvo. As micropartículas são aceleradas a uma certa velocidade, atravessam a parede celular, as membranas plasmática e nuclear, e no núcleo o DNA é liberado, podendo ser integrado ao DNA cromossomal (Droste et al. 2002; Homrich et al. 2012; Wiebke-Strohm et al. 2012).

*Agrobacterium* é uma bactéria aeróbica, gram-negativa, fitopatogênica da família Rhizobiaceae, que naturalmente infecta diferentes plantas (DeCleene & DeLey, 1976). Esses fitopatógenos causam uma variedade de neoplasias incluindo a doença da galhada-coroa (*crown-gall- A. tumefaciens*) e formação de raízes adventícias (*hairy root- A. rhizogenes*) nos locais de infecção (Gelvin, 2010). *A. tumefaciens* é amplamente utilizada para transferir de forma estável sequências de DNA desejadas para o genoma de células vegetais. Uma das vantagens deste método é o fato de que um menor número de cópias do T-DNA (parte do plasmídeo) são introduzidas no tecido vegetal (Kohli et al. 2003; Wiebke-Strohm et al. 2011).

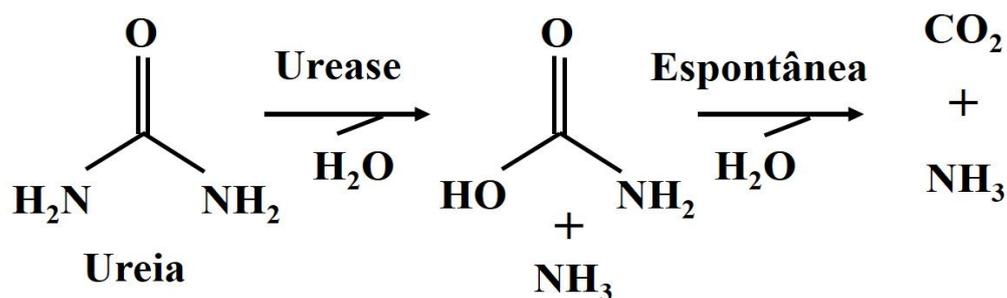
*A. rhizogenes* também é capaz de co-transferir o T-DNA de vetores plasmidiais binários para as células hospedeiras, permitindo assim, integrar construções gênicas de interesse de forma estável no genoma vegetal (Christey, 2001; Broothaerts et al. 2005).

Este método tem sido bastante utilizado, pois permite a obtenção de plantas compostas, que apresentam somente raízes transformadas, reduzindo significativamente o tempo necessário para gerar eventos transgênicos, quando comparado aos métodos tradicionais de transformação de soja. As raízes transformadas apresentam crescimento rápido, são altamente ramificadas e capazes de crescer na ausência de reguladores de crescimento (Sevón et al. 1998; Collier et al. 2005). Construções gênicas contendo genes repórteres, tais como *gfp*, que codifica a proteína verde fluorescente (*GFP-green-fluorescent protein*), tem auxiliado bastante no uso desta técnica, para a seleção das raízes transformadas (Collier et al. 2005). O uso da *A. rhizogenes* tem sido bastante importante para aplicações biotecnológicas, tais como a identificação de genes, que quando superexpressos em raízes, apresentam potencial tóxico à patógenos que atacam este órgão (Guillon et al. 2006).

### 1.3 Ureases

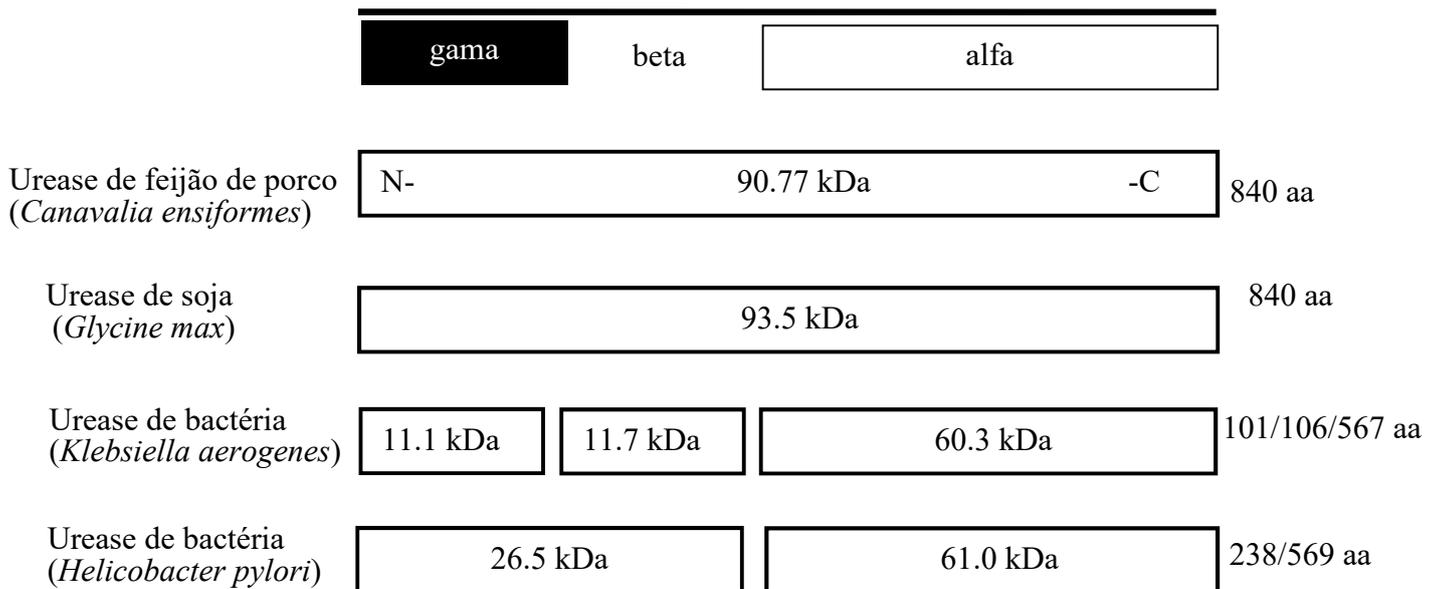
São enzimas multifuncionais, com diferentes domínios de atividade (Carlini e Polacco, 2008). Em 1926, Sumner cristalizou pela primeira vez uma urease da semente de feijão de porco, *Canavalia ensiformis* (*Jack Bean urease-JBU*), provando definitivamente a origem protéica desta enzima. A urease foi a primeira molécula orgânica a ser sintetizada em laboratório (Wöhler, 1828). Estudos realizados com a proteína JBU demonstraram pela primeira vez que se trata de uma metaloenzima dependente de níquel (Dixon et al. 1975).

As ureases são conhecidas tradicionalmente por catalisar a hidrólise da ureia, produzindo amônia e carbamato. Em pH fisiológico, o carbamato é hidrolisado espontaneamente para formar gás carbônico e uma segunda molécula de amônia (Mobley et al. 1995) (Figura 2). A planta somente pode aproveitar o nitrogênio presente na ureia após ser catalisada pela urease (Follmer, 2008). Portanto, a urease está envolvida na remobilização do nitrogênio, bem como na assimilação de nitrogênio primário (Cao et al. 2010).



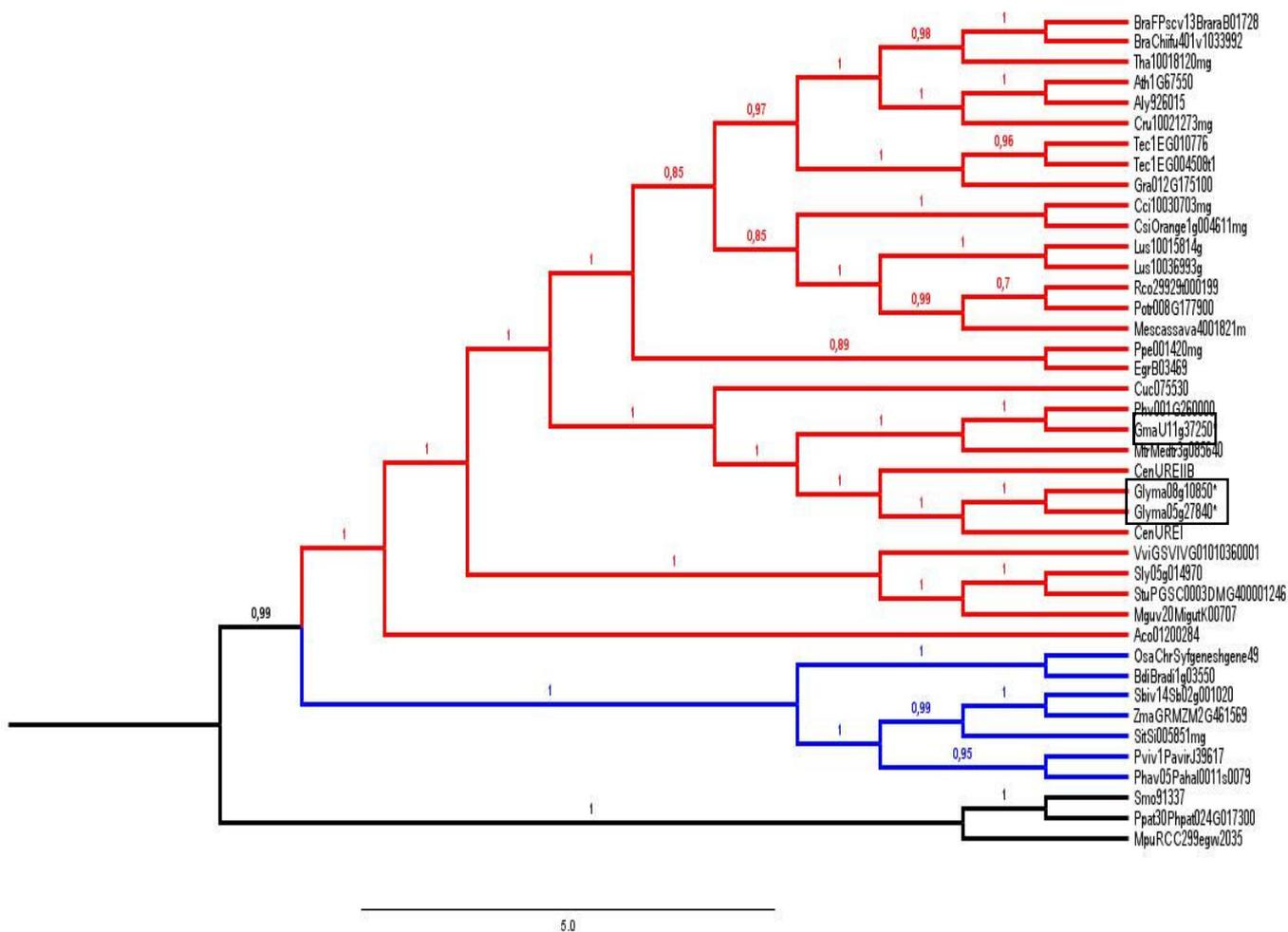
**Figura 2.** Reação de hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease. (Fonte: Adaptado a partir de Witte CP, 2011).

Vários grupos de organismos sintetizam ureases, dentre eles bactérias, fungos e plantas. Estas enzimas são ubiquamente presentes em todos os tecidos das plantas, mas não são encontradas nos animais (Mobley & Hausinger, 1989; Ligabue-Braun et al. 2013). Nas plantas e fungos as ureases são proteínas homo-oligoméricas, formadas por trímeros ou hexâmeros de subunidades idênticas de aproximadamente 90-kDa. No entanto, as ureases de bactérias são multímeros formados por duas ou três subunidades designadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Independente do organismo as ureases apresentam alto grau de similaridade entre as sequências de aminoácidos (maior que 50% entre bactérias e plantas e maior que 70% dentro de cada grupo) (Figura 3) (Mobley et al. 1995; Follmer, 2008, Krajewska, 2009, Ligabue-Braun et al. 2013). A comparação estrutural das ureases de plantas com as já conhecidas das bactérias *Klebsiella aerogenes* (Jabri et al. 1995), *Bacillus pasteurii* (Benini et al. 1999) e *Helicobacter pylori* (Ha et al. 2001) foi possível devido à resolução da estrutura tridimensional da urease de *C. ensiformis* (JBU) (Balasubramanian & Ponnuraj, 2010), permitindo assim a confirmação do alto grau de similaridade entre as ureases de diferentes organismos.



**Figura 3.** Comparação esquemática dos domínios das ureases de diferentes organismos. Ureases de plantas (*Canavalia ensiformes* e *Glycine max*) são formadas por subunidades idênticas. Ureases bacterianas podem ter três subunidades (*Klebsiella aerogenes*) ou duas (*Helicobacter pylori*). (Fonte: Adaptado a partir de Krajewska, 2009).

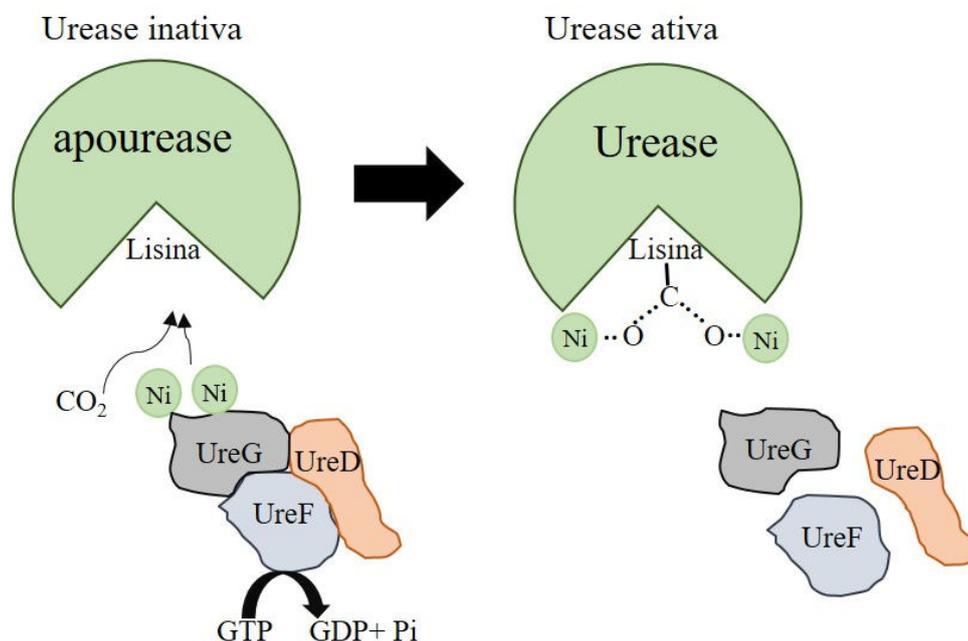
A comparação entre as sequências de aminoácidos de 41 ureases sugere que todas as ureases divergiram de uma proteína ancestral comum em Viridiplantae, contudo as ureases de monocotiledôneas e eudicotiledôneas tem evoluído independentemente ao longo do tempo (Figura 4) (Wiebke-Strohm et al. 2016).



**Figura 4.** Análise filogenética de ureases de plantas, musgos e algas. Clado em azul consiste em ureases de monocotiledôneas, em vermelho de plantas eudicotiledôneas e em preto clado basal. Asterisco e as caixas representam as ureases de soja. (Fonte: Wiebke-Strohm et al. 2016).

A ativação das ureases é um processo complexo. Nas plantas e bactérias requer a participação de chaperonas chamadas de proteínas acessórias das ureases, para que ocorra a incorporação de dois íons de níquel (Ni) à enzima. Essa ligação é precisa e forte (Follmer, 2008; Balasubramanian & Ponnuraj, 2010). Nas bactérias, quatro proteínas acessórias são necessárias: UreD, UreF, UreG, UreE, que formam um complexo que se liga ao metalocentro, sendo UreE uma chaperona de Ni que facilita a entrega desse metal para o sítio ativo da urease (Mobley et al. 1995; Zambelli et al. 2011). Em plantas e fungos o processo de incorporação do níquel é pouco conhecido. Foram identificadas para soja

três proteínas acessórias (UreD, UreF, UreG) (Figura 5) (Freyermuth et al. 2000; Bacanamwo et al. 2002; Polacco et al. 2011).



**Figura 5.** Modelo da ativação de urease de planta envolvendo a ligação das três proteínas acessórias (UreD, UreF e UreG) à apourease: modificação covalente de um sítio ativo de lisina e incorporação específica de dois íons de níquel por sítio ativo. As proteínas acessórias se dissociam da urease após a ativação. (Fonte: Adaptado a partir de Witte CP, 2011).

#### 1.4 Ureases em Plantas

Grande parte dos estudos com ureases vegetais foram realizados com *C. ensiformis* e *G. max*. As ureases de *C. ensiformis* (feijão de porco) são melhor caracterizadas em nível bioquímico (Sirko & Brodzik, 2000; Carlini e Polacco, 2008; Follmer, 2008).

Em *C. ensiformis* são encontradas três isoformas estruturais da urease: JBU foi a primeira enzima a ser cristalizada por Summer em 1926. A segunda isoforma foi isolada e caracterizada em 1981 e denominada canatoxina (CNTX), sendo menos abundante na semente do que JBU (Carlini e Guimarães, 1981; Follmer et al. 2001). Uma terceira proteína desta família (JBUREII) foi encontrada em diferentes etapas de desenvolvimento das flores, dos embriões e da plântula (Pires-Alves et al. 2003; Demartini et al. 2011;

Mulinari et al. 2011). Até o presente momento apenas JBU e JBUREII têm as sequências completas de DNA/aminoácidos elucidadas (Mamiya et al. 1985; Riddles et al. 1991; Pires-Alves et al. 2003; Mulinari et al. 2011).

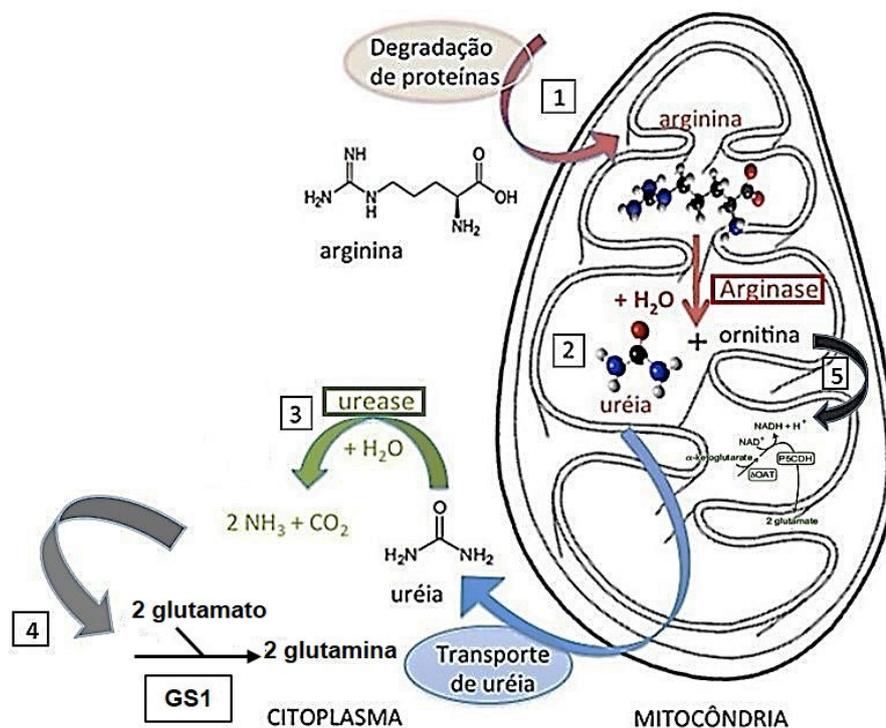
Em soja são descritas três isoformas, codificadas por três genes estruturais independentes. A urease ubíqua, codificada pelo gene *Eu4* (Glyma11g248700; GenBank acesso AJ276866), expresso em níveis baixos em todos os tecidos vegetais, é responsável pela reciclagem da ureia derivada do metabolismo (Polacco et al. 1985; Torisky et al. 1994; Goldraij et al. 2003). A urease embrião-específica, codificada pelo gene *Eu1* (Glyma05g146000; GenBank acesso NM001249869), é altamente expressa em embriões em desenvolvimento e acumulada em sementes maduras (Polacco & Havir, 1979; Polacco & Winkler, 1984; Polacco & Holland, 1993). Um terceiro gene codificando uma urease foi recentemente identificado no genoma da soja (Polacco et al. 2011; Polacco et al. 2013). Este gene foi denominado *Eu5* (Glyma08g103000) e seu produto SBU-III, apresenta uma maior similaridade com a urease embrião-específica (Figura 4). Baixos níveis de transcritos foram detectados em sementes após um dia da quebra da dormência, raízes jovens e sementes em desenvolvimento (Wiebke-Strohm et al. 2016).

Afim de definir o papel das ureases de soja, experimentos foram direcionados para a obtenção de mutantes nulos por bombardeamento com nêutrons rápidos cuja coleção pertence à Universidade de Missouri, EUA. Mutantes nulos para a urease embrião-específica (*eu1-a*) foram obtidos com sucesso. Esses mutantes não exibem nenhuma alteração fisiológica na planta (Polacco et al. 2011). Mutantes *missense* para urease ubíqua foram denominados *eu4-a* e *eu4-b*, produzem uma proteína inativa e exibem substancial redução na atividade ureolítica em folhas, raízes e hipocótilos, devido a mutação ser na região de inserção do níquel (Torisky & Polacco, 1990; Stebbins et al. 1991; Witte et al. 2002; Goldraij et al. 2003; Polacco et al. 2011). Por outro lado, mutantes nulos para a urease ubíqua nunca foram obtidos. Os duplos mutantes (*eu1-a/eu4-a*), obtidos através do cruzamento entre os mutantes para urease ubíqua e embrião-específica, são praticamente desprovidos de atividade ureolítica (Stebbins e Polacco, 1995; Goldraij et al. 2003). Mutante nulo para o gene *Eu3* que codifica a proteína acessória UreG, necessária para a incorporação do níquel e ativação da urease, também foi obtido e não apresenta atividade ureolítica (Freyermuth et al. 2000).

## 1.5 Papel das Ureases

### 1.5.1 Papel das Ureases em relação à atividade ureolítica

As ureases desempenham diferentes funções biológicas nas plantas (Follmer et al. 2004; Carlini e Polacco, 2008; Carlini e Ligabue-Braun, 2016). A primeira função atribuída é a atividade ureolítica. Grande parte do nitrogênio (N) utilizado pela planta para seu crescimento e desenvolvimento só pode ser aproveitada a partir da ureia, que é uma importante fonte interna e externa de N (Follmer, 2008; Wang et al. 2008). A arginina, o principal armazenador de N, é convertida pela enzima mitocondrial arginase em ureia e ornitina. A ureia é transportada para o citoplasma e pela ação da urease é convertida a dióxido de carbono e amônia, que é incorporada em compostos orgânicos, principalmente pela atividade da glutamina sintetase (Figura 6) (Mobley et al. 1995; Goldraij e Polaccoc, 1999, 2000; Sirko e Brodzik, 2000). Portanto, a urease exerce um papel importante na remobilização e assimilação do N necessário para o desenvolvimento (Cao et al. 2010).



**Figura 6.** Metabolismo da uréia em plantas. O aminoácido arginina proveniente da degradação de proteínas (1). A arginina é hidrolisada na mitocôndria pela arginase,

produzindo ureia e ornitina (2). A ureia deixa a mitocôndria e é hidrolisada pela urease (3). O produto da atividade da urease, a amônia, é liberado e re-assimilado pela glutamina sintetase citosólica (GS1) (4). O glutamato gerado a partir da ornitina é exportado da mitocôndria e serve como substrato para a reação citosólica (GS1) (5). A urease é requerida para mobilizar metade do nitrogênio da arginina. (Fonte: Adaptado a partir de Witte CP, 2011 e Laprotox: Disponível em <http://www.ufrgs.br/laprotox/>>Acesso em setembro de 2016).

Devido à importância do nutriente N para o crescimento da planta, torna-se necessário um mecanismo eficiente para capturar e realocar fontes de N para sua utilização em processos essenciais da planta como a germinação de sementes e senescência (Witte CP, 2011). Em *Arabidopsis thaliana* a importância da urease é destacada pelo fato de que quando suas sementes são tratadas com um inibidor para esta enzima sua germinação é atrasada (Zonia et al. 1995). Os mutantes de soja *eu3-a eu2-a*, *eu4-a* e *eu4-b*, que exibem atividade ureolítica nula, apresentam acúmulo de ureia e a presença de manchas necróticas na ponta das folhas (Polacco & Holland, 1993; Goldraj et al. 2003).

### 1.5.2 Papel de defesa das ureases

As ureases não estão envolvidas apenas na remobilização e assimilação do N necessário para o desenvolvimento da planta, mas também na defesa de plantas contra patógenos tais como fungos e insetos (Carlini e Polacco, 2008; Stanisçuaski e Carlini, 2012). Os domínios da atividade fungicida e inseticida são independentes da capacidade de hidrólise da enzima, devido as funções de defesa continuarem agindo mesmo após as ureases serem tratadas quimicamente com um inibidor da atividade ureolítica (Polacco e Holland, 1993; Follmer et al. 2004; Becker-Ritt et al. 2007).

Estudos evidenciaram que as ureases purificadas a partir de plantas apresentam uma toxicidade contra insetos e fungos, com atividade independente da catalítica. Alguns trabalhos (Carlini et al. 1997; Ferreira da Silva et al. 2002) mostraram que duas isoformas de *Canavalia ensiformis*, Canatoxina (CNTX) e *Jack bean urease* (JBU), e a urease embrião específica de soja (Follmer et al. 2004) são tóxicas para insetos que apresentam no seu trato digestivo enzimas proteolíticas do tipo catepsinas, que degradam a proteína e liberam um peptídeo tóxico. Para JBU o peptídeo liberado apresenta aproximadamente ~10 kDa, não sendo tóxico para insetos com digestão baseada em enzimas serínicas do

tipo tripsina (Carlini et al. 1997; Stanisçuaski et al. 2005; Piovesan et al. 2008; Stanisçuaski e Carlini, 2012).

A função inseticida das ureases parece restrita à urease de plantas, o que provavelmente se deve ao fato de pelo menos parte do peptídeo entomotóxico corresponder ao gap presente entre os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  das ureases bacterianas (Figura 3) (Follmer et al. 2004). O peptídeo entomotóxico de ~10 kDa isolado a partir da canatoxina é denominado pepcanatox (Carlini et al. 1997; Carlini et al. 2000). Posteriormente, a região correspondente a um outro peptídeo tóxico foi identificada, isolada e clonada a partir do gene *jbureII*, outra isoforma de urease da *C. ensiformis*. O peptídeo resultante foi denominado jaburetox-2Ec (Mulinari et al. 2007) ou jaburetox (Postal et al. 2012).

O jaburetox recombinante mostrou atividade inseticida contra ninfas de *Dysdercus peruvianus* e *Rhodnius prolixus* (Stanisçuaski et al. 2005, 2009). Curiosamente, o peptídeo não mostrou somente toxicidade a esses insetos, mas também a insetos que não eram afetados por ingestão da urease intacta como a lagarta *Spodoptera frugiperda*, que apresenta digestão baseada em enzimas serínicas do tipo tripsina (Mulinari et al. 2007). Por outro lado, mostrou-se inócuo se injetado intraperitonealmente ou administrado por via oral em ratos neonatos e camundongos (Mulinari et al. 2004, 2007; Tomazetto et al. 2007). O peptídeo tóxico age diretamente sobre túbulos de Malpighi isolados do inseto. Os polipeptídeos inibem a diurese em doses abaixo do nanomolar, sendo que as rotas de sinalização recrutadas pela urease e pelo peptídeo para produzir o efeito antidiurético são diferenciadas (Stanisçuaski et al. 2009).

Quanto à atividade antifúngica, as ureases e jaburetox têm mostrado exercer forte propriedades contra fungos fitopatogênicos filamentosos e leveduras na concentração de  $10^{-5}$  M (peptídeo) a  $10^{-8}$  M (ureases), inibindo o crescimento vegetativo *in vitro* de fungos filamentosos (Becker-Ritt et al. 2007; Postal et al. 2012; Wiebke-Strohm et al. 2012). O polipeptídeo afeta a permeabilidade da membrana e interfere no metabolismo energético de leveduras (Becker-Ritt et al. 2007; Postal et al. 2012).

## **1.6 Efeito da superexpressão de genes que codificam ureases de soja**

Embora investigações com ureases venham sendo realizadas há quase um século, estudos relacionados a sua função e seu modo de ação merecem ainda atenção, pois não

estão totalmente compreendidos. O estudo da superexpressão dos genes que codificam ureases é uma forma de auxiliar em uma melhor compreensão de suas funções.

Experimentos de transformação de soja por bombardeamento com o objetivo inicial de gerar plantas que superexpressassem a urease ubíqua (*Eu4*) e possivelmente resistentes a adversidades bióticas foram conduzidos em nosso laboratório (Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, do Departamento de Genética da UFRGS). Vários eventos foram obtidos, mas ao contrário da superexpressão prevista, houve uma co-supressão do gene alvo na maioria das plantas. Os níveis de mRNA da urease ubíqua de todas as plantas transgênicas eram menores que os observados em plantas não transgênicas, submetidas às mesmas condições de cultura. O mesmo foi observado para a atividade ureásica, indicando um menor acúmulo da enzima nas plantas transgênicas. Bioensaios realizados no estudo com estas plantas mostraram que a falta da urease ubíqua torna as plantas mais susceptíveis a diversos fungos (Wiebke-Strohm et al. 2012).

Algumas hipóteses foram levantadas para explicar o ocorrido: o grande número de cópias integradas ao genoma na transformação por bombardeamento, a intolerância das plantas a altos níveis da urease ubíqua, a existência de um mecanismo endógeno de auto-regulação dos níveis de mRNA ou a toxicidade da proteína (Wiebke-Strohm et al. 2011). Após inúmeras tentativas de transformação através do método que integra bombardeamento e *Agrobacterium* (Wiebke-Strohm et al. 2011) foi obtida uma planta transformada contendo um menor número de cópias do transgene e com níveis de expressão do gene aumentados. Contudo, esta planta apresentou desenvolvimento lento e acabou morrendo (dados não publicados). Tal fato, motivou a busca de outras alternativas para superexpressão das ureases em soja, sendo a opção mais oportuna, em função do número de estudos prévios, a expressão de partes dos genes que codificam os peptídeos tóxicos.

Tendo em vista que as ureases são potencialmente multifuncionais, as plantas co-suprimidas são consideradas uma ferramenta importante para a determinação das funções adicionais à atividade ureásica. Considerando que mutantes nulos para a urease ubíqua (*Eu4*) nunca foram obtidos até o presente momento, as plantas transgênicas co-suprimidas representam uma poderosa ferramenta para estudos funcionais que poderão contribuir para a elucidação do papel das ureases de soja em outros processos biológicos, tais como o desenvolvimento de plantas.

## 1.7 Peptídeo recombinante derivado de urease de soja

Mais recentemente a equipe da doutora Célia Carlini do Laboratório de Proteínas Tóxicas (Laprottox) da UFRGS, identificou a região que corresponde ao peptídeo tóxico da urease ubíqua de soja, que foi denominado Soyuretox (Kappaun, 2014). A identificação da sequência interna da urease ubíqua de soja colinear com a sequência interna do Jaburetox peptídeo derivado de uma urease de *C. ensiformis*, foi realizada através do alinhamento entre os aminoácidos componentes do Jaburetox e a sequência de aminoácidos correspondente na urease ubíqua. O peptídeo da urease ubíqua da soja foi chamado de Soyuretox e apresenta 72% de identidade com o Jaburetox (figura 7) (Kappaun, 2014).



**Figura 7.** (A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de Soyuretox e Jaburetox. (\*) correspondem em ambos os peptídeos. (:) forte similaridade; (.) fraca similaridade. (B) Sequência de aminoácidos da urease ubíqua traduzida do gene *Eu4* de

*Glycine max* (Glyma11g37250;AJ276866), com sequência do peptídeo interno Soyuretox marcada em cinza. Fonte: (Kappaun, 2014).

## **1.8 Justificativa**

Assim como os insetos, os nematóides também apresentam no seu trato digestório enzimas proteolíticas das classes cisteína e aspártico proteases, o que sugere um possível potencial tóxico das ureases vegetais também contra nematóides. Até o presente momento nenhum trabalho foi realizado para compreender a resposta das ureases frente ao ataque desse patógenos.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar o possível efeito tóxico das ureases contra nematoides. Como mencionado acima, em nosso laboratório foram realizados experimentos de transformação por bombardeamento com o objetivo inicial de gerar plantas de soja que superexpressassem a urease ubíqua de soja (Wiebke-Strohm et al. 2012). Tendo em vista a dificuldade de superexpressar a urease intacta, utilizou-se a alternativa de isolar o peptídeo tóxico denominado Soyuretox, derivado da urease ubíqua da soja e superexpressá-lo na planta, visando maior resistência a adversidades bióticas.

## **1.9 Objetivos**

### **1.9.1 Objetivos gerais**

Os objetivos gerais deste trabalho foram (1) caracterizar em nível molecular a progênie de plantas transgênicas com o gene *Eu4* co-suprimido e investigar o papel das ureases de soja durante o desenvolvimento das plantas. (2) caracterizar *in vivo* a toxicidade do peptídeo Soyuretox, codificado por parte do gene *Eu4* da soja, contra nematoides, usando como modelo o fitonematoide formador de galhas *Meloidogyne javanica*.

### **1.9.2 Objetivos específicos**

- a) Caracterizar molecularmente a progênie de plantas transgênicas com os genes que codificam ureases co-suprimidos.

- b) Determinar o perfil de expressão das ureases codificadas pelos genes *Eu1*, *Eu4* e *Eu5* em plantas transgênicas e não transgênicas; mutantes (*eu1-a*, *eu4-a*, *eu1-a/eu4-a*, *eu3-a*) e não mutantes.
- c) Avaliar o padrão temporal de desenvolvimento de plantas transgênicas e não transgênicas, mutantes (*eu1-a*, *eu4-a*, *eu1-a/eu4-a*, *eu3-a*) e não mutantes.
- d) Obter plantas compostas através da transformação por *Agrobacterium rhizogenes* superexpressando nas raízes o peptídeo Soyuretox.
- e) Obter e regenerar plantas estavelmente transformadas, por bombardeamento de partículas, superexpressando o Soyuretox.
- f) Caracterizar em nível molecular as plantas transgênicas obtidas pela transformação de raízes e por transformação estável.
- g) Desafiar as raízes transgênicas das plantas compostas e das plantas completamente transformadas com o fitonematoide formador de galhas, *M. javanica*;
- h) Comparar o fator reprodutivo do nematoide *M. javanica* nas raízes transgênicas das plantas compostas, completas e raízes controles (plantas com raízes não-transformadas).

Os capítulos seguintes desta tese incluem um artigo já aceito para a publicação na revista *Genetics and Molecular Biology*, da Sociedade Brasileira de Genética, um manuscrito submetido a revista *Transgenic Research* e o de Termo de Adição encaminhado a um pedido de patente previamente depositado no INPI. Os resultados destes trabalhos também foram apresentados de forma parcial à comunidade científica em eventos nacional e internacional. Os resultados obtidos neste trabalho podem fornecer uma alternativa para a obtenção de plantas de soja mais resistentes a adversidades bióticas.

**Capítulo IV**  
**CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

---

## 4. Conclusões e Perspectivas

### 4.1 Análise das plantas transgênicas com o gene *Eu4* co-suprimido

A análise das plantas transgênicas obtidas por Wiebke-Strohm et al. (2012), confirmou que a co-supressão do gene *Eu4* (urease ubíqua) foi mantida ao longo das gerações. Além disto, a redução dos níveis de mRNA foi também observada para os genes *Eu1* (urease embrião específica) e *Eu5* (SBU-III). Portanto, a co-supressão ocorreu para todas as ureases da soja, resultado que pode ser atribuído ao fato de existir um alto grau de similaridade entre as sequências (Follmer, 2008; Krajewska, 2009). Mesmo apresentando o silenciamento de todas as ureases, as plantas co-suprimidas representam variantes genéticas importantes para o avanço no estudo funcional das ureases, uma vez que mutantes nulos para urease ubíqua nunca haviam sido obtidos.

O papel das ureases quanto ao padrão de desenvolvimento da planta de soja foi analisado no presente trabalho. Esse processo biológico foi investigado em plantas transgênicas e comparados com plantas não transgênicas. Para fins de estudo funcional de genes individuais os mutantes simples *eul-a*, *eu4-a* e *eu3-a*, duplo *eul-a/eu4-a*, foram utilizados e comparados com plantas não mutantes. As plantas mutantes foram também caracterizadas quanto ao nível de expressão das três ureases. Para os mutantes *eu4-a* e *eu3-a*, foram observados níveis normais de transcritos de mRNA para todas as ureases. Estes resultados eram esperados já que *eu4-a* produz uma proteína inativa (Torisky e Polacco, 1990; Stebbins et al. 1991; Witte et al. 2002; Goldraj et al. 2003; Polacco et al. 2011) e *eu3-a* codifica a proteína acessória UreG (Freyermuth et al. 2000). Estas mutações, portanto, não alteram o nível de expressão dos genes *Eu4*, *Eu1* e *Eu5*, quando estimado pelo perfil de transcritos. Os outros mutantes, *eul-a* e *eul-a/eu4-a*, exibiram apenas níveis menores para *Eu1*, uma vez que *eul* é um mutante nulo para urease embrião específica (Polacco et al. 1993).

Os resultados obtidos indicaram que as plantas com co-supressão dos genes que codificam ureases apresentaram um comprometimento no seu desenvolvimento, com redução do peso, do tamanho da parte aérea e do sistema radicular, além de menor conteúdo de nitrogênio, se comparadas com as plantas controles. O mutante simples *eu3-*

*a* e o duplo mutante *eu1-a/eu4-a* apresentaram um pequeno atraso no desenvolvimento durante o primeiro mês. O conjunto de dados resultante deste trabalho indicam que a urease embrião específica e urease SBU-III possam também estar contribuindo em processos que estejam relacionadas ao desenvolvimento.

Esse conjunto de plantas apresentando as urease co-suprimidos representam, também, uma ferramenta importante para a elucidação das funções adicionais à atividade ureolítica. No trabalho realizado por Wiebke-Strohm et al. (2012) utilizando essas mesmas plantas, foi demonstrado que a urease ubíqua de soja está envolvida no mecanismo de resistência ao fungo *Phakopsora pachyrhizi* (causador da ferrugem asiática), pois mostraram maior número de lesões e pústulas, quando comparadas com plantas não transformadas. Essas plantas também poderão ser utilizadas em futuros bioensaios *in vivo* utilizando nematoides de importância agrônômica, a fim de comparar a resposta das plantas silenciadas com plantas superexpressando o peptídeo soyuretox. Além disto teste nos quais as referidas plantas serão desafiadas com insetos alvo e não-alvo para a soja, poderão servir como prova de conceito para a capacidade inseticida desta enzima.

#### **4.2 Transformação de soja mediada por *Agrobacterium rhizogenes* e bombardeamento de partículas**

A transformação genética é uma ferramenta potencial para o aumento da qualidade das culturas e para a superação dos limites impostos pelo ambiente ao aumento da produção (Popelka et al. 2004). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação e regeneração de plantas para cada espécie vegetal, bem como a realização de estudos funcionais, visando identificar genes que possam conferir características de interesse.

Tanto o bombardeamento de partículas quanto o sistema *Agrobacterium* têm sido utilizados para introdução de genes em diversos tecidos da soja e regeneração de plantas completamente transformadas (Somers et al. 2003; Mello-Farias e Chaves, 2008; Wiebke-Strohm et al. 2011; Kuma et al. 2015). Cabe ressaltar que o método de obtenção de raízes transformadas por *A. rhizogenes* é também uma ferramenta bastante útil para testar o efeito de genes de interesse em um curto espaço de tempo. Isso é especialmente importante em estudos envolvendo características do sistema radicular, tais como doenças causadas por patógenos de raiz (Cho et al. 2000).

Conforme resultados apresentados no Capítulo 3, foram regeneradas com sucesso plantas de soja totalmente transgênicas e férteis expressando o peptídeo soyuretox e plantas compostas expressando o peptídeo somente na raiz. As plantas compostas foram obtidas em algumas semanas, enquanto que as plantas completamente transformadas, após pelo menos um ano (contando a obtenção de embriões somáticos, etapas de transformação, seleção e regeneração dos transformantes primários).

É importante salientar que independentemente do método utilizado, a transformação de soja não é um trabalho trivial, exigindo muita experiência e habilidade do pesquisador. A “arte” de regenerar plantas a partir da cultura de tecidos transformados é um ponto crucial para o sucesso dos programas de transformação genética. Por isso, torna-se importante o treinamento e desenvolvimento de habilidades dos pesquisadores para gerar plantas suficientes, tanto em trabalhos de estudos funcionais de genes como para a obtenção de plantas de interesse agrônomico (Trick et al. 1997; Somers et al. 2003).

#### **4.3 Análise da toxicidade do peptídeo Soyuretox contra o ataque do fitonematóide *M. javanica*.**

Em nosso laboratório, como já mencionado anteriormente, foram realizados experimento de transformação visando a superexpressão da urease ubíqua. Embora um número considerável de eventos tenha sido obtido, apenas uma planta foi capaz de superexpressar o gene moderadamente (4 vezes mais do que a controle), enquanto as demais plantas transgênicas apresentaram co-supressão (Wiebke-Strohm et al. 2012). Entretanto, a planta que superexpressava o gene não deixou descendentes. Com o intuito de obter plantas transgênicas superexpressando a urease ubíqua, novos experimentos de transformação foram conduzidos em nosso laboratório, porém novamente não foram obtidas plantas com esta característica. Devido à dificuldade de superexpressar a urease ubíqua completa, a alternativa mais promissora e viável no momento foi estudar a expressão de partes do gene que codifica esta urease de soja, correspondente ao peptídeo tóxico.

Recentemente, a equipe da doutora Célia Carlini do Laboratório de Proteínas Tóxicas (Laprottox) da UFRGS, identificou a região que corresponde ao peptídeo tóxico da urease ubíqua de soja, que foi denominado Soyuretox (Kappaun, 2014). Este resultado possibilitou investigar as propriedades de defesa da urease ubíqua, adicionais à atividade ureolítica.

Os resultados obtidos no padrão de expressão do peptídeo Soyuretox demonstraram ser possível superexpressar o peptídeo tanto nas raízes obtidas através da transformação por *A. rhizogenes*, quanto nas plantas totalmente transformadas, obtidas por bombardeamento. Em bioensaios as plantas compostas e completamente transformadas revelaram ser mais resistentes a *M. javanica* do que as plantas controle, mostrando uma redução na reprodução deste nematóide em torno de 50% e 37.5%, respectivamente.

As plantas transgênicas superexpressando o Soyuretox representam uma alternativa promissora para fornecer um controle eficaz contra esse tipo de patógeno, diminuindo assim o gasto com nematicida e, conseqüentemente, contribuindo com uma melhor qualidade do meio ambiente.

Esse trabalho tem fundamental importância para o avanço do conhecimento das propriedades tóxicas do Soyuretox sobre nematóides por dois motivos principais: (1) este é o primeiro relato de um peptídeo derivado de uma urease que apresenta atividade nematicida e (2) comprova que esse peptídeo contribui para função de defesa da planta *in vivo*, mesmo na presença de outras proteínas de defesa. Assim, os dados obtidos destacam o potencial do Soyuretox para uma aplicação biotecnológica.

Novos experimentos de transformação visando a superexpressão do Soyuretox pela técnica de bombardeamento foram realizadas, usando um novo vetor de superexpressão, o pEarleyGate100, que tem o promotor CaMV 35S controlando o gene de interesse, além do gene marcador *bar*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Do ponto de vista de estudos básicos, este vetor facilita a seleção das plantas transgênicas em populações segregantes. As análises moleculares destas plantas confirmarão o estado transgênico, o grau de expressão e a estabilidade do transgene nas gerações descendentes.

Os resultados obtidos até o presente momento são altamente promissores, pois demonstraram expressiva resistência das plantas transgênicas ao ataque do nematóide *M. javanica*. As plantas resultantes desses dois experimentos de transformação poderão ser utilizadas não apenas em bioensaios *in vivo* com outros nematóides de importância agrônômica, mas também testadas contra insetos alvos e não-alvos e fungos como por exemplo o *P. pachyrhizi* (causador da ferrugem asiática). Esses dados servirão como prova de conceito para a capacidade tóxica do peptídeo e confirmarão seu potencial para geração de um futuro produto biotecnológico.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  
DOS CAPÍTULOS I E V**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacanamwo M, Witte CP, Lubbers MW, Polacco JC (2002) Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Mol Genet Genomics* 268:525–534.

Balasubramanian A, Ponnuraj K (2010) Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J Mol Biol* 400:274-283.

Barros R, Borges EP (2007) Doenças da cultura da soja Soja Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2006/2007 Disponível em <[www.fundacaomsorgbr/requestphp?65](http://www.fundacaomsorgbr/requestphp?65)>

Barros R (2009) Doenças da Cultura da Soja Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2008/2009, pp 109-122 Disponível em [www.fundacaomsorgbr/requestphp?97](http://www.fundacaomsorgbr/requestphp?97).

Becker-Ritt AB, Martinelli AH, Mitidieri S, Feder V, Wassermann GE, Santi L, Vainstein MH, Oliveira JT, Fiuza LM, Pasquali G, Carlini CR (2007) Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50:971-983.

Bird DM, Kaloshian I (2003) Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:115–123.

Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LMA, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 43:(3)629-633.

Cao F-Q, Werner AK, Dahncke K, Romeis T, Liu L-H, Witte CP (2010) Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiol* 15:98-108.

Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA (1997) Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin like enzymes. *J Econ Entomol* 90:340-348.

Carlini CR, Guimarães JA (1981) Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19:667-675.

Carlini CR, Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits, ME C Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção Patente de invenção: PI0003334-0, DEINPI/RS País: Brasil Data de depósito: 06/06/2000.

Carlini CR, Polacco JC (2008) Toxic Properties of Urease. *Crop Sci* 48:1665-1672.

Carlini C, Liagabue- Braun R (2016) Ureases as multifunctional toxic proteins: A review *Toxicon* 110:90-109.

Chitwood DJ, Perry RN (2009) Reproduction, physiology and biochemistry Chapter 8, In RN Perry, M Moens and JL Starr, (eds) *Root-knot Nematodes* CABI, Wallingford, UK, pp 488.

Cho HJ, Farrand SK, Noel GR (2000) High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta* 210:195-204.

Christey, MC (2001) Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants in Vitro. *Cell Dev Biol Plant* 37:687–700.

Collier R, Fuchs B, Walter N, Kevin LW, Taylor CG (2005) Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J* 43:449-457.

Companhia Nacional De Abastecimento (CONAB) Acompanhamento da safra brasileira de grãos, 2016 Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em julho 2016.

Coodetec (2002) Doenças emergentes em soja Cascavel: Coodetec: Bayer. *Crop Science* p51.

DeCleene, M, DeLey, J (1976) The host range of crown gall. *Botanical Gazette* 42: 389-466.

Demartini DR, Carlini CR, Jay JT (2011) Global and targeted proteomics in developing jack bean (*Canavalia ensiformis*) seedlings: an investigation of urease isoforms mobilization in early stages of development. *Plant Mol Biol* 75:53-65.

Dias, W P, Garcia, A, Silva, JFV, Carneiro, GE de S (2010) Nematoides de soja: identificação e controle Embrapa: Circular Técnica, 76 eds.

Dita MA, Rispaill N, Prats E, Rubiales D, Singh KB (2006) Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147:1-24.

Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zerner B (1975) Letter: Jack bean urease (EC 3515) A metalloenzyme A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc* 97:4131-4133.

Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2002) Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica*, 127:367-376.

Embrapa Soja, disponível em: <<http://www.cnpsoembrapa.br>> Acesso em outubro de 2016.

Ferreira Da Silva CT, Gombarovits MEC, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR (2002) Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes *Arch Insect Biochem Physiol* 44:62-71.

Finer JJ (1988) Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max*(L) Merrill]. *Plant Cell Rep* 7:238-241.

Finer JJ, McMullen MD (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissues. *In Vitro Cell Dev Biol* 27:175-182.

Follmer C (2008) Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69:18-28.

Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo C, Guimaraes JA, Carlini CR (2001) Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia*

ensiformis), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 360:217-224.

Follmer C, Real-Guerra R, Wasserman GE, Olivera-Severo D, Carlini CR (2004) Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem* 271:1357-1363.

Freyermuth SK, Bacanamwo M, Polacco JC (2000) The soybean *Eu3* gene encodes an Ni-binding protein necessary for urease activity. *Plant J* 21:53-60.

Fuller VL, Lilley CJ, Urwin PE (2008) Nematode resistance *New Phytologist* 180:27-44.

Gelvin SB (2010) Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic Transformation. *Annual Review Phytopathology* 48:45-68.

Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a model plant family: genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol* 137:1228-1235.

Goldraij A, Polacco JC (1999) Arginase is inoperative in developing soybean seeds. *Plant Physiol* 119:297-304.

Goldraij A, Polacco JC (2000) Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons. *Planta* 210:652-658.

Goldraij ALJ, Beamer Polacco JC (2003) Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiol* 132:1801-1810.

Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, Pati, PK, Rideau M, Gantet PH (2006) The potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol* 24:403-409.

Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol* 8:505-509.

Hartman GL, West ED, Herman TK (2011) Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Sec* 3:5-17.

Homrich MS, Wiebke-Strohm B, Weber RLM, Bodanese-Zanettini MH (2012) Soybean genetic transformation: a valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genetics and Molecular Biology* 35:998-1010.

Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.

Kappaun, K (2014) Clonagem e expressão da urease da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* FP2 e do peptídeo soyuretox, derivado da urease ubíqua de soja (*Glycine max*) Dissertação (Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS Brasil pp 88.

Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Weget E, Stoger E, Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 152:247-258.

Krajewska B (2009) Ureases I Functional, catalytic and kinetic properties: A review *J Mol Catal B Enzymatic* 59:9-21.

Kuma KM, Lopes-Caitar VS, Romero CCT, Silva SMH, Kuwahara MK, Carvalho MCCG, Abdelnoor RV, Dias WP, Marcelino-Guimarães FC (2015) A high efficient protocol for soybean root transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and most stable reference genes for RT-qPCR analysis. *Plant Cell Rep* 34(11):1987-2000.

Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, Karplus PA (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* 268: 998-1004.

Jeyaratnam J (1990) Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat Quaterly* 43(3):139-144.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGH, Kikuchi T, Manzanilla-Lópe R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 14(9): 946-961.

Laboratório de Proteínas Tóxicas/Universidade Federal do Rio Grande do Sul Disponível em: <http://www.ufrgs.br/laprotox/>>Acesso em setembro 2016.

- Ligabue-Braun R, Andreis FC, Verli H, Carlini CR (2013) 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases. *Naturwissenschaften* 100:459-467.
- Liu K (2008) Food use of whole soybeans In Johnson PJW, Galloway R, (eds) *Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization*. Urbana IL: AOCS Press pp441-482.
- Mamiya G, Takishima K, Masakuni M, Kayumi T, Ogawa K, Sekita T (1985) Complete Amino-Acid Sequence of Jack Bean Urease Proceedings of the Japan. Academy Series B-Physical and Biological Sciences 61:395-398.
- Mello-Farias PC, Chaves ALS (2008) Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on soybean. *Sci Agric* 65:95-106.
- Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis In: *In vitro embryogenesis in plants*, TA Thorpe, (eds) Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands pp155-203.
- Mobley HLT, Hausinger RP (1989) Microbial ureases-significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews* 53:85-108.
- Mobley HL, Island MD, Hausinger RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59:451-480.
- Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) Meloidogyne species-a diverse group of novel and important plant parasites In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds) *Root-Knot Nematodes* Wallingford, Oxfordshire: CAB International, p 1-17
- Mulinari F, Staniscuaski F, Bertholdo-Vargas LR, Postal M, Oliveira-Neto OB, Rigden DJ, Grossi-de-Sa MF, Carlini CR (2007) Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28:2042-2050.
- Mulinari F, Becker-Ritt AB, Demartini, DR, Ligabue-Braun R, Staniscuaski F, Verli H, Fragozo RR, Schroeder EK, Carlini CR, Grossi-de-Sá MF (2011) Characterization of JBURE-IIb Isoform of *Canavalia ensiformis* (L) DC Urease. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 1814:1758-1768.

Mulinari F, Freitas-Silva MA, Grossi-de-Sa MF, Moraes MG, Kurtenbach E, Carlini CR (2004) Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas (INPI-RS 001120, Brazil) pp 8-4.

Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, den Nijs L, Hockland, S, Maafi ZT (2011) Current nematode threats to world agriculture In: Jones JT, Gheysen G and Fenoll C (eds) Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions Heidelberg: Springer, p 21-44.

Pazhavarical S (2009) Investigation on the early stages of interactions between the nematodes *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus thornei* and two of their plant hosts Thesis (PhD) University of Western Sydney, Sydney.

Piovesan AR, Staniscuaski F, Marco-Salvadori J, Real-Guerra R, Defferrari MS, Carlini CR (2008) Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease Insect. Biochem Mol Biol 38:1023-1032.

Pires-Alves M, Grossi-de-Sa MF, Barcellos GB, Carlini CR, Moraes MG (2003) Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L) DC]. Plant Cell Physiol 44:139-145.

Polacco JC, Havir EA (1979) Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. J Biol Chem 254:1707-1715.

Polacco JC, Winkler RG (1984) Soybean leaf urease: a seed enzyme? Plant Physiology 74:800-803.

Polacco JC, Krueger RW, Winkler RG (1985) Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. Plant Physiol Heidelberg: Springer 79:794-800.

Polacco JC, Holland MA (1993) Roles of urease in plant cells. International Review of Cytology 14:(5)65-103.

Polacco JC, Hyten DL, Medeiros-Silva Ma, Sleper DA, Bilyeu KD (2011) Mutational analysis of the major soybean UreF paralogue involved in urease activation. *J Exp Bot* 62:1-10.

Polacco JC, Mazzafera P, Tezotto T (2013) Opinion - Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science* 199-200:79-90.

Popelka JC, Terryn N, Higgins TJV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Sci* 167:195-206.

Postal M, Martinelli AHS, Becker-Ritt AB, Ligabue-Braun R, Demartini DR, Ribeiro SFF, Pasquali G, Gomes VM, Carlini CR (2012) Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. *Peptides* 38:22-32.

Proite K (2007) Busca de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao nematóide das galhas (*Meloidogyne arenaria*) Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília p 220.

Reetz ER, Snatos C, Corrêa S, Silveira Dd, Carvalho Cd, Beling RR (2008) Anuário

Brasileiro da Soja In: Beling RR (ed) Anuário Brasileiro da Soja p 136.

Riddles PW, Whan V, Blakeley RL, Zerner B (1991) Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene* 108:265-267.

Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends Biotechnology* 6(12):299-302.

Sasser JN (1979) Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries In: Lamberti, F, Taylor, CE (eds) *Root-knot nematodes (Meloidogyne species): systematics, biology and control*. London: Academic Press, p 256-268.

Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer J, Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports* p 408-413.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, et al (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183.

Sevón N, Hiltunen R, Oksman-Caldentey K-M (1998) Somaclonal variation in *Agrobacterium* transformed roots and protoplast-derived hairy root clones. *Hyoscyamus muticus* *Plant Med* 64:37-41.

Sirko A, Brodzik R (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* 47:1189-1195.

Somers DA, Samac DA, Olhoft PM (2003) Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol* 131:892-899.

Stanisçuaski F, Ferreira-DaSilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR (2005) Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45:753-760.

Stanisçuaski F, Brugge TEV, Carlini CR, Orchard I (2009) *In vitro* effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J Insect Physiol* 55:255-263.

Stanisçuaski F, Carlini CR (2012) Plant Ureases and Related Peptides: Understanding Their Entomotoxic Properties. *Toxins* 4:55-67.

Stebbins N, Holland MA, Cianzio SR, Polacco JC (1991) Genetic Tests of the Roles of the Embryonic Ureases of Soybean. *Plant Physiol* 97:1004-1010.

Stebbins N, Polacco JC (1995) Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol* 109:169-175.

Sumner JB (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J Biol Chem* 69:435-444.

Thorpe TA (1994) Morphogenesis and regeneration In: Vasil, KI, Thorpe, TA (eds) *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academic: Netherland, p17-36.

Tomazetto G, Mulinari F, Stanisçuaski F, Settembrini BP, Carlini CR, Ayub MAZ (2007) Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E coli encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology* 41:821-827.

Torisky RS, Polacco JC (1990) Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development. *Plant Physiol* 94:681-689.

Torisky RS, Griffin JD, Yenofsky RL, Polacco JC (1994) A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Mol Gen Genet* 242:404-414.

Trick HN, Dinkins RD, Santarém ER, Di R, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ, Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation *Plant Tissue Cult Biotechnol* 3:9-26.

UNITED STATES Department of Agriculture Foreign Agricultural Service (FSA-USDA) PSD Online - Custom Query Disponível em: <<http://appsfasusdagov/psdonline/psdQuery.aspx>> Acesso em: maio de 2016.

Urwin PE, Levesley A, McPherson MJ, Atkinson HJ (2000) Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *Arabidopsis thaliana* plants expressing proteinase inhibitors. *Molecular Breeding* 6(8):257-264.

Zambelli B, Musiani F, Benini S, Ciurli S (2011) Chemistry of Ni (2+) in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis *Acc. Chem Res* 44:520-530.

Zonia LE, Stebbins N, Polacco JC (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol* 107:1097-1103.

Wang G, Xu Y (2008) Hypocotyl-based Agrobacterium-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference. *Plant Cell Rep* 27:1177-1184.

Wang WH, Kohler B, Cao FQ, Liu LH (2008) Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Sci* 175:467-477.

Wiebke-Strohm B, Droste A, Pasquali G, Osório MB, Bucker-Neto L, Passaglia LMP, Bencke M, Homrich MS, Margis-Pinheiro M, Bodanese-Zanettini MH (2011) Transgenic

fertile soybean plants derived from somatic embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. *Euphytica* (Wageningen) 177:343-354.

Wiebke-Strohm B, Pasquali G, Margis-Pinheiro M, Bencke M, Bucker-Neto L, Becker-Ritt AB, Martinelli AHS, Rechenmacher C, Polacco JC, Stolf R, Marcelino FC, Abdelnoor RV, Homrich MS, Del Ponte EM, Carlin CR, De Carvalho MCCG, Bodanese-Zanettini MH (2012) Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. *Plant Mol Biol* 78:1-13.

Wiebke-Strohm B, Ligabue-Braun R, Rechenmacher C, De Oliveira-Busatto LA Carlini CR, Bodanese-Zanettini MH (2016) Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family. *Plant Physiology and Biochemistry* (Paris) 101:96-104.

Williamson VM, Gleason CA (2003) Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6:327-333.

Witte CP (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Science* 180:431-438.

Witte CP, Tiller SA, Taylor MA, Davies HV (2002) Leaf urea metabolism in potato Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of (<sup>15</sup>N) after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol* 128:1129-1136.

Wöhler F (1828) Über künstliche bildung des harnstoffs. *Ann Phys Chem* 253-256.

## **Anexos**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

---

RESEARCH ARTICLE

Open Access

## Expression of an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* confers drought tolerance in transgenic soybean

Ricardo Luis Mayer Weber<sup>1\*</sup>, Beatriz Wieble-Szohm<sup>1\*</sup>, Christian Brademeier<sup>1</sup>, Márcia Margis-Pinheiro<sup>1</sup>, Govani Greigh de Brito<sup>2</sup>, Ciliana Rechenmacher<sup>1</sup>, Paulo Fernando Bertagnoli<sup>3</sup>, Maria Eugênia Lisei de Sá<sup>4</sup>, Magnólia de Araújo Campos<sup>5</sup>, Regina Maria Santos de Amorim<sup>5</sup>, Magda Aparecida Beneventi<sup>5</sup>, Rogério Margis<sup>1</sup>, Maria Fátima Grossi-de-Sa<sup>1,2\*</sup> and Maria Helena Bodanese-Zanetti<sup>1,2\*</sup>

### Abstract

**Background:** Drought is by far the most important environmental factor contributing to yield losses in crops, including soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). To address this problem, a gene that encodes an osmotin-like protein isolated from *Solanum nigrum* var. *americanum* (SnOLP) driven by the UBQ3 promoter from *Arabidopsis thaliana* was transferred into the soybean genome by particle bombardment.

**Results:** Two independently transformed soybean lines expressing SnOLP were produced. Segregation analyses indicated single locus insertions for both lines. qPCR analysis suggested a single insertion of SnOLP in the genomes of both transgenic lines, but one copy of the *hpt* gene was inserted in the first line and two in the second line. Transgenic plants exhibited no remarkable phenotypic alterations in the seven analyzed generations. When subjected to water deficit, transgenic plants performed better than the control ones. Leaf physiological measurements revealed that transgenic soybean plants maintained higher leaf water potential at predawn, higher net CO<sub>2</sub> assimilation rate, higher stomatal conductance and higher transpiration rate than non transgenic plants. Grain production and 100 grain weight were affected by water supply. Decrease in grain productivity and 100 grain weight were observed for both transgenic and non transgenic plants under water deficit; however, it was more pronounced for non transgenic plants. Moreover, transgenic lines showed significantly higher 100 grain weight than non transgenic plants under water shortage.

**Conclusions:** This is the first report showing that expression of SnOLP in transgenic soybeans improved physiological responses and yield components of plants when subjected to water deficit, highlighting the potential of this gene for biotechnological applications.

**Keywords:** Abiotic stress, Bombardment, Drought tolerance, Genetic transformation, *Glycine max*, Osmotin, Water deficit

\* Correspondence: fatmagrossi@embrapa.br; maria.zanetti@ufrgs.br  
Tigui@ufrgs.br

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Av. Bento Gonçalves, 9500, CP 12051, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



***Phakopsora pachyrhizi* Infection Bioassay in Detached Soybean Transgenic Leaves  
for Candidate Gene Validation**

Beatriz Wiebke-Strohm<sup>1</sup>, Cíliana Rechenmacher<sup>1</sup>, Luisa Abruzzi de Oliveira<sup>1</sup>, Cláudia Vieira Godoy<sup>2</sup> and Maria Helena Bodanese Zanettini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina, Brazil

\*For correspondence: [mhbzanettini@yahoo.com.br](mailto:mhbzanettini@yahoo.com.br)

**[Abstract]** Soybean (*Glycine max*) is one of the most important crops in the world. *Phakopsora pachyrhizi* is a plant pathogenic basidiomycete fungus that infects soybean, causing Asian Soybean Rust (ASR) disease and affecting production. Here, we describe how to prepare the plant material and the uredospore suspension (from spores harvested from leaves exhibiting sporulating uredinia) for *in vitro* leaf infection. Plant material is sprayed with the uredospore suspension and incubated for 12 days. During the incubation period, the presence of lesions and pustules is visually verified. After this incubation period, the leaves are classified according to the lesion type. The number of uredospores per cm<sup>2</sup> of leaf was also estimated. The detached-leaf assay is routinely used to test fungicide efficiency (Scherb and Mehl, 2006). Detached-leaf, greenhouse and field results have been shown to be significantly correlated (Twizeyimana *et al.*, 2007). The present protocol was adapted from the two publications cited above. The usefulness of this approach for studying *P. pachyrhizi* infection on transgenic soybean was previously demonstrated by our research team (Wiebke-Strohm *et al.*, 2012; Bencke-Malato *et al.*, 2014).



Research article

Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family



Beatriz Wiebke-Strohm<sup>a,1,3</sup>, Rodrigo Ligabue-Braun<sup>b,2</sup>, Ciliana Rechenmacher<sup>a,1</sup>,  
Luisa Abruzzi De Oliveira-Busatto<sup>a,1</sup>, Célia Regina Carlini<sup>b,c,3</sup>,  
Maria Helena Bodanese-Zanettini<sup>a,\*,3</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 90610-000, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2015

Received in revised form

28 January 2016

Accepted 28 January 2016

Available online 1 February 2016

Keywords:

*Glycine max*

Urea amidohydrolase

Expression profile

3D-structure

Urease

ABSTRACT

In plants, ureases have been related to urea degradation, to defense against pathogenic fungi and phytophagous insects, and to the soybean–*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. Two urease isoforms have been described for soybean: the embryo-specific, encoded by *Eu1* gene, and the ubiquitous urease, encoded by *Eu4*. A third urease-encoding locus exists in the completed soybean genome. The gene was designated *Eu5* and the putative product of its ORF as SBU-III. Phylogenetic analysis shows that 41 plant, moss and algal ureases have diverged from a common ancestor protein, but ureases from monocots, eudicots and ancient species have evolved independently. Genomes of ancient organisms present a single urease-encoding gene and urease-encoding gene duplication has occurred independently along the evolution of some eudicot species. SBU-III has a shorter amino acid sequence, since many gaps are found when compared to other sequences. A mutation in a highly conserved amino acid residue suggests absence of ureolytic activity, but the overall protein architecture remains very similar to the other ureases. The expression profile of urease-encoding genes in different organs and developmental stages was determined by RT-qPCR. *Eu5* transcripts were detected in seeds one day after dormancy break, roots of young plants and embryos of developing seeds. *Eu1* and *Eu4* transcripts were found in all analyzed organs, but *Eu4* expression was more prominent in seeds one day after dormancy break whereas *Eu1* predominated in developing seeds. The evidence suggests that SBU-III may not be involved in nitrogen availability to plants, but it could be involved in other biological role(s).

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.