



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Validação funcional de genes
envolvidos com estresse de
Meloidogyne incognita via RNA
interferente *in planta***

Isabela Tristan Lourenço

**Brasília – DF
Fevereiro – 2014**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Validação funcional de genes
envolvidos com estresse de
Meloidogyne incognita via RNA
interferente *in planta***

Isabela Tristan Lourenço

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientador: Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso

Tese apresentada ao
departamento de Biologia Celular
do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de
Brasília como requisito parcial à
obtenção do grau de doutor (a) em
Biologia Molecular

Brasília, Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ângela Mehta

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Elíbio Rech

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Érika V. Saliba Albuquerque

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Janice de Almeida-Engler

INRA – Sophia Antipolis - França

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso (Co-orientador)

Embrapa Cerrados

Dr. José Dijair Antonino de Souza Júnior (Suplente)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a minha orientadora, Dra. Maria Fátima Grossi de Sá pelo apoio, orientação, aprendizado e confiança no meu trabalho.
- Agradeço ao Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso, por acompanhar e auxiliar todos os experimentos para o bom andamento da tese.
- Agradeço a Dra. Regina Carneiro pelo suporte e todos os ensinamentos no Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Agradeço a Dra. Janice de Almeida-Engler e ao Dr. Gilbert Engler pelo período que me receberam no INRA, por todos os ensinamentos nas análises histológicas e hibridização *in situ*.
- Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da UnB.
- Agradeço ao Diogo Martins de Sá, pela ajuda na transformação das plantas e caracterização das mesmas.
- Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, vocês são muitos, não vou ficar colocando o nome de todos...
- Agradeço a minha amiga mais palhaça Anne Winne de Paula, menina mulher, que esteve sempre ao meu lado.
- Agradeço a minha querida amiga Janaína Matias Lima de Paula, apesar de ficarmos muito tempo sem contato, descobri o quão valiosa é a sua amizade. Você é um exemplo de mulher, mãe, pesquisadora e o mais importante de tudo amiga! Tenho certeza que a minha caminhada até finalizar a tese não teria sido a mesma coisa sem o seu apoio e carinho...
- Agradeço ao Lucas Tessutti pelo apoio, carinho, amor...pela felicidade que trouxe a minha vida! Amor meu....Te amo!!
- Agradeço a minha amada família Mãe, Pai, Má (e Marina), Kico (Anna Julia e Victor): vocês são as pessoas mais importantes na minha vida, sem vocês eu jamais teria chegado até aqui. Obrigada por todo o apoio, carinho, amor e compreensão. Amo cada um de vocês de uma forma imensurável...

**Agradeço a Deus, pois nenhum
obstáculo é grande demais quando
confiamos Nele.**

**“Onde você quer chegar?
Ir alto.
Sonhe alto,
queira o melhor do melhor,
queira coisas boas para a vida.
pensamentos assim trazem para nós
aquilo que desejamos.**

**Se pensarmos pequeno,
coisas pequenas teremos.**

**Já se desejarmos fortemente o melhor
e principalmente lutarmos pelo melhor,
o melhor vai se instalar na nossa vida”**

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABELAS.....	12
ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	18
1- INTRODUÇÃO	
1.1-Introdução geral.....	19
1.2-O Filo Nematoda.....	21
1.3-Fitonematoides endoparasitas sedentários.....	23
1.4-Interferência mediada por RNA (RNAi).....	27
1.5-O uso do RNAi em plantas de interesse comercial.....	31
1.6-O uso do RNAi <i>in planta</i> para o controle de fitonematoides.....	36
1.5-Isocitrato liase.....	41
1.6-Proteína de choque térmico 90.....	44
2 - HIPÓTESE.....	46
3 - JUSTIFICATIVA.....	46
4 - OBJETIVOS	
4.1-Objetivo geral.....	47
4.2-Objetivos específicos.....	47
5 - MATERIAL E MÉTODOS	
5.1-Cultura de nematoides.....	49
5.2-Extração de ovos.....	49
5.3-Extração de juvenis.....	50
5.4-Extração de fêmeas.....	50
5.5-Extração de RNA total.....	51

5.6- Reação de Transcrição Reversa.....	52
5.7-RT-PCR.....	52
5.8- Amplificação dos fragmentos gênicos da biblioteca de cDNA de J2pp.....	54
5.9- Clonagem e Extração de DNA plasmidial.....	54
5.10- Sequenciamento e análise das sequências.....	55
5.11- Subclonagem em vetor para RNAi.....	55
5.12- Células eletrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
5.13- Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i>	60
5.14- Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR).....	62
5.15- Seleção das plantas transformadas com as construções para silenciamento gênico.....	63
5.16- Bioensaios de infecção de <i>M. incognita</i> em eventos de <i>N. tabacum</i> expressando dsRNA's.....	64
5.17- PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes-alvo em <i>M. incognita</i> que infectaram eventos de <i>N. tabacum</i> expressando dsRNA.....	64
5.18- Análise morfológica das células gigantes nas plantas expressando dsRNA's dos genes-alvo por microscopia.....	65
5.19- Hibridização <i>in situ</i> whole mount de J2pp.....	67

6 - RESULTADOS

6.1- Seleção dos genes-alvo.....	68
6.2- Escolha de regiões específicas dos genes-alvo de <i>M. incognita</i> para silenciamento via RNAi.....	70
6.3- Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes-alvo em diferentes estádios de vida de <i>M. incognita</i>	72
6.4- Localização do mRNA por hibridização <i>in situ</i> whole mount.....	77
6.5- Subclonagem das regiões selecionadas dos genes-alvo em vetor binário.....	78

6.6- Transformação de <i>N. tabacum</i> e seleção dos eventos transformados na geração T1 das construções pK7GWIWG2(I)- <i>hsp90</i> e pK7GWIWG2(I)- <i>icl</i>	82
6.7 - Bioensaios dos eventos transformados contra <i>M. incognita</i>	86
6.8- Análise da expressão dos transcritos dos genes <i>icl</i> e <i>hsp90</i> em ovos recuperados de plantas transgênicas expressando dsRNA.....	92
6.9- Análise morfológica das células gigantes nas plantas expressando dsRNA's dos genes-alvo.....	93
7 – DISCUSSÃO.....	100
7.1 - A expressão de dsRNA da proteína de choque térmico 90 atrasa a formação da galha e reduz a reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i>	101
7.2 - A expressão de dsRNA de Isocitrato Liase <i>in planta</i> reduz drasticamente o sucesso reprodutivo de <i>Meloidogyne incognita</i>	105
8 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	109
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Meloidogyne incognita</i>	26
Figura 2 Via de geração de siRNAs.....	30
Figura 3 Representação esquemática do mecanismo de RNAi em <i>Meloidogyne incognita</i>	39
Figura 4 Juvenil 2 de <i>Meloidogyne incognita</i>	41
Figura 5 Ciclo do Glioxilato.....	43
Figura 6 Desenho esquemático do plasmídeo de entrada pDONR221.....	56
Figura 7 Representação esquemática para clonagem de genes utilizando a metodologia Gateway®.....	58
Figura 8 Desenho esquemático do plasmídeo para RNAi pk7GWIWG2(I).....	59
Figura 9 Análise <i>in silico</i> de EST's de <i>Meloidogyne incognita</i> encontrados no banco de dados.....	73
Figura 10 Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos do gene Isocitrato liase em <i>M.incognita</i> nos 4 estádios de vida.....	75
Figura 11 Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos do gene <i>hsp90</i> em <i>M.incognita</i> nos 4 estádios de vida.....	76
Figura 12 Hibridização <i>in situ</i> whole mount dos genes <i>hsp90</i> e Isocitrato Liase em juvenis 2 pré-parasitas de <i>M. incognita</i>	78
Figura 13 Amplificação dos fragmentos gênicos de Isocitrato Liase e <i>hsp90</i>	80
Figura 14 Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7icl.....	81
Figura 15 Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7hsp90.....	82
Figura 16 Explantes de <i>Nicotiana tabacum</i>	85
Figura 17 Germinação de sementes de <i>Nicotiana tabacum</i> em meio MS.....	87
Figura 18 Efeito das plantas expressando dsRNA para a construção pK7GWIWG2(I)-Isocitrato liase no ciclo de vida de <i>M. incognita</i>	90

Figura 19 Efeito das plantas expressando dsRNA para a construção pK7GWIWG2(I)- <i>hsp90</i> no ciclo de vida de <i>M. incognita</i>	91
Figura 20 Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos do gene <i>hsp90</i> em ovos de <i>M. incognita</i> coletados de plantas expressando dsRNA	93
Figura 21 Número de galhas por grama de raiz (14DAI e 28DAI) das plantas controle e plantas expressando dsRNA <i>hsp90</i>	95
Figura 22 Número de galhas por grama de raiz (14DAI e 28 DAI) das plantas controle e plantas expressando dsRNA Isocitrato liase.....	96
Figura 23 Imagens de campo claro de células gigantes 14 DAÍ de galhas de raízes de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	98
Figura 24 Imagens de campo claro de células gigantes 28 DAÍ de galhas de raízes de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Genes-alvo de fitonematoides controlados efetivamente por RNAi.....	31
Tabela 2 Análise comparativa dos genes-alvo com o GenBank™	33
Tabela 3 Composição dos meios para transformação e regeneração de explantes de <i>Nicotiana tabacum</i>	35
Tabela 4 Genes-alvo de fitonematoides controlados efetivamente por RNAi.....	37
Tabela 5 Análise comparativa dos genes-alvo com o GenBank™	71
Tabela 6 Composição dos meios para transformação e regeneração de explantes de <i>Nicotiana tabacum</i>	83

ABREVIATURAS

Amp^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	“expressed sequence tags”, etiquetas de transcritos
g	Gramma
G	Aceleração da gravidade
GM	Geneticamente modificada
Kb	Kilobase
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampere
mG	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NBT	Nitro Blue Tetrazole
NFC	Nematoide formador de cisto
NFG	Nematoide formador de galha
ng	Nanograma
OD	densidade ótica
Pb	Par de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação polimerásica em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
qRT-PCR	PCR quantitativo, PCR em tempo real
Rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAase	Ribonuclease
RNAi	RNA interferente
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
rRNA	RNA ribossomal
siRNA	RNA interferente pequeno
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
μF	Micro Faraday
μg	Micrograma

μL	Microlitro
Mm	Micrômetro
μM	Micromolar

RESUMO

O fitonematoide *Meloidogyne incognita* é considerado um dos patógenos de plantas mais relevantes devido a sua distribuição mundial e os danos severos causados a várias culturas importantes agronomicamente. Práticas agrônômicas têm tido geralmente pouco sucesso e alto custo, sendo o cultivo de variedades resistentes, quando existentes, a forma mais eficiente de controle. Uma estratégia alternativa promissora é a transformação genética de plantas para expressão de moléculas que afetem o metabolismo e desenvolvimento do nematoide. No presente trabalho foram selecionados dois genes-alvo homólogos a genes essenciais do nematoide modelo *Caenorhabditis elegans* para silenciamento gênico de *M. incognita in planta*: Isocitrato liase e *hsp90*. Visando a validação desses genes, para o controle deste fitonematoide, os fragmentos gênicos foram isolados e clonados em um vetor binário para expressão de dsRNA *in planta*. Plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* contendo as construções de RNAi foram obtidas através de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas expressando dsRNA de *hsp90* apresentaram uma atraso na formação de galhas e menor número de células gigantes, observado aos 14 DAI. Os bioensaios com as plantas de tabaco GM nas gerações T1 e T2 mostraram os efeitos do silenciamento dos genes-alvo na reprodução do nematoide. Os testes de resistência mostraram, 45 DAI, uma redução média de 65% nos ovos por grama de raiz nas plantas expressando dsRNA de Isocitrato liase e redução média de 30% nas plantas expressando dsRNA de *hsp90*. A análise do silenciamento de *hsp90* em ovos coletados das plantas expressando dsRNA foi confirmada por qRT-PCR. Em

conclusão, genes-alvo com efeitos essenciais foram encontrados, exercendo papel importante no desenvolvimento e reprodução do nematoide. Portanto, essa metodologia pode ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica para indução de resistência ao fitonematoide *M. incognita* em grandes culturas de interesse comercial.

ABSTRACT

The phytonematode *Meloidogyne incognita* is considered the most important plant pathogen, because its worldwide distribution and the severe damage caused to a large variety of agronomically important crops. The phytopathogen has a life cycle that is divided in six developmental stages (Egg, Juvenile 1-4, Female) that can persist for 6 to 8 weeks. The Juvenile 2 enters the root using mechanical force and enzymatic degradation to establish the plant-pathogen interaction that finally differentiates in female that deposit 2,000 eggs. Current agronomic practices have usually been unsuccessful and expensive, so the cultivation of resistant varieties is actually the most efficient way to control nematodes. In this work, we selected target genes for silencing homologues lethal genes of the model nematode *Caenorhabditis elegans*. Aiming validation of these target genes, the fragments were isolated, cloned in RNAi binary vector for tobacco transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. After this, tobacco seeds were collected and genotyped to select the transformed ones. Bioassays on GM tobacco showed the effects of silencing in the nematode reproduction. The resistance tests conducted with GM tobacco at 45 DAI showed a reduction of 65% in eggs per root gram in transgenic lines of Isocitrate lyase and 30% in transgenic lines of *hsp90*. In conclusion, we found new target genes that showed deleterious phenotype in nematodes. Therefore, this methodology can be used as a promising biotechnological tool to induce nematode resistance in GM crops.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Introdução Geral

No Brasil a agricultura é um dos principais pilares da economia, sendo as principais culturas produzidas: algodão, soja, milho, feijão, café e cana-de-açúcar (CONTINI, 2006a). Em 2011, o Produto Interno Bruto do agronegócio brasileiro avançou 5,73%, totalizando 942 bilhões de reais. Essas culturas vêm contribuindo cerca de 25% do PIB nos últimos dez anos (CONTINI, 2006b), com tendências a aumentar, além de gerar, direta e indiretamente empregos na cadeia de produção ou em derivados (AVELLAR, 2006). A maioria dessas culturas é plantada em grandes áreas e principalmente em monocultivo, sendo a produção afetada pelo ataque de pragas e patógenos. Os principais causadores de doenças em plantas são: insetos, fungos, bactérias, vírus e nematoides.

Os nematoides são seres muito abundantes e diversificados, podendo representar 80% dos indivíduos do reino Animalia (PLATT, 1999), com estimativas de cem mil a um milhão de espécies (DE LEY ;BLAXTER, 2002) compondo o filo Nematoda. A maioria dos nematoides é de vida livre e se alimentam de algas, bactérias, fungos ou até mesmo de outros nematoides. Um segundo grupo compreendem os nematoides parasitas, que parasitam hospedeiros de diferentes filios e reinos. Dentre os parasitas, existem os fitonematoides, que estão distribuídos globalmente e exercem um impacto econômico severo na agricultura através da infestação de culturas agronomicamente importantes (LILLEY, *et al.*, 2012). Em 1987, o prejuízo

mundial estimado causado por esses fitonematoides foi de 70 bilhões de dólares (SASSER ;FRECKMAN, 1987), em 2008 estima-se que esse prejuízo chegou a cerca de 157 bilhões de dólares (ABAD, *et al.*, 2008).

Atualmente, existem quatro principais formas de controle de fitonematoides: controle químico, controle biológico, práticas de manejo e quarentena. No entanto, nenhuma dessas práticas vem obtendo sucesso suficiente. A principal forma utilizada é o cultivo de variedades naturalmente resistentes, que apresenta dificuldade devido ao fato dessa resistência ser restrita a determinadas raças de fitonematoides (NG'AMBI, *et al.*, 1999). A segunda forma é o controle químico, que aplica o uso de nematicidas sintéticos. Esse tipo de abordagem tem alto custo, além de apresentar riscos de contaminação para o meio ambiente e de intoxicação do agricultor e consumidor (JEYARATNAM, 1990). Além disso, como os nematoides passam a maior parte do seu ciclo de vida no interior das raízes, a ação da maioria dos nematicidas é dificultada. Em relação a agrotóxicos, estima-se que o custo para o controle de fitonematoides pode chegar a três vezes a soma dos gastos com insetos, fungos e plantas daninhas (BIRD, 2003). A metodologia de rotação de cultura não vem demonstrando resultados efetivos em virtude da utilização inadequada do solo, aumento da área de produção e principalmente devido aos hábitos polípagos das principais espécies como *M. incognita* e *M. javanica* (TRUDGILL ;BLOK, 2001).

Considerando que os programas de melhoramento genético encontram certas dificuldades para geração de variedades resistentes em várias plantas hospedeiras, um grande potencial pode ser reconhecido na engenharia genética (WILLIAMSON ;KUMAR, 2006). Por isso, estratégias moleculares

visando à transformação genética de plantas têm sido propostas nos últimos 15 anos a fim de induzir resistência em plantas de forma eficiente, ou seja, minimizando o custo de produção e os riscos ambientais. O desenvolvimento de plantas GM resistentes a nematoides poderia aumentar a produtividade das lavouras e reduzir consideravelmente o impacto causado pelo uso de nematicidas. A busca por genes essenciais do patógeno que possam ser silenciados via RNAi e, conseqüentemente, impedir o desenvolvimento do nematoide, é uma estratégia promissora que vem sendo bastante estudada.

1.2. O filo Nematoda e os fitonematoídes

O filo Nematoda constitui um dos grupos mais difuso de animais na terra. Em termos de números de indivíduos, constituem um grupo muito abundante: quatro de cinco animais na biosfera são nematoides (BALDWIN JG, 1999). Apesar de serem organismos microscópicos, este grupo de animais multicelulares é capaz de explorar uma grande variedade de habitats, como os oceanos, água doce, solo, vivendo como parasitas de plantas e animais, ou mesmo em condições extremas, como em solos Antárticos. Por um longo tempo, o estudo das formas parasitárias de nematoides foi realizado devido à elevada importância econômica que eles assumem nas áreas médicas, veterinárias e agrícolas. No entanto, o filo Nematoda contém uma variedade de espécies com diversos ciclos de vida e tipos de alimentação, tornando-os extremamente importante nos diferentes ecossistemas (YEATES, *et al.*, 1993). Em ecossistemas terrestres, nematoides que se alimentam de micro-organismos, conjuntamente com outra microfauna, possuem um papel

fundamental na teia alimentar de decomposição de matéria orgânica, nutrientes e detritos no solo. Outras espécies são parasitas de plantas, vertebrados, invertebrados ou predadores de pequenos organismos, características que os tornam extremamente adequados como bioindicadores (YEATES, *et al.*, 1993; BONGERS ;FERRIS, 1999).

Antigamente, a divisão do Filo era feita baseada em taxonomia clássica. Entretanto, com o advento das técnicas de biologia molecular houve uma maior facilidade e capacidade de melhor compreensão da filogenia do Nematoda. Como resultado, o filo foi subdividido em duas classes: Enoplea e Chromadorea, que incluem três subclasses e dezessete ordens (DE LEY P, 2006). Foram descritas aproximadamente 27.000 espécies sendo 4.500 parasitas de plantas, 11.500 parasitas de animais e 14.000 de vida livre (HUGOT J-P, 2001). No entanto, o número de espécies existentes pode chegar a um valor muito mais elevado, variando de 100.000 a 1 milhão (LAMBSHEAD, 1993; BALDWIN JG, 1999).

Baseado em filogenia molecular, os nematoides parasitas de plantas evoluíram independentemente pelo menos três vezes, duas vezes na classe Enoplea e uma vez na classe Chromadorea (BLAXTER ML, 1998; ML., 2002). Apesar do parasitismo geralmente ser reportado como tendo evoluído de ancestrais de nematoides de vida livre, a origem precisa de cada grupo parasita do Filo Nematoda é desconhecida (BLAXTER ML, 1998).

1.3 Fitonematoides endoparasitas sedentários

Os fitonematoides endoparasitas sedentários mais danosos são agrupados em três gêneros: *Meloidogyne*, também chamados de nematoides formadores de galhas (NFG), *Heterodera* e *Globodera*, chamados de nematoides formadores de cisto (NFC) (SASSER, 1980). Quatro espécies são responsáveis por 95% das infestações por NFG em áreas agrícolas no mundo: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* e *Meloidogyne hapla*. Dentre os NFG, a espécie *Meloidogyne incognita*, devido a sua distribuição mundial (SASSER, *et al.*, 1983; TRUDGILL, 1995), reprodução apomítica e vasta gama de plantas hospedeiras (JEPSON, 1987; EHWAETI, *et al.*, 1999), é provavelmente o patógeno mais importante de plantas cultivadas. Patógenos de solo são de difícil controle e os NFG possuem dificuldades ainda mais particulares devido a sua vasta gama de hospedeiros, curto ciclo de vida e altas taxas reprodutivas (TRUDGILL ;BLOK, 2001). Esses fitonematoides induzem a formação de sítios de alimentação especializados nas raízes das plantas, os quais dão suporte para o desenvolvimento e reprodução durante o ciclo de vida (GHEYSEN ;VANHOLME, 2007).

O desenvolvimento e a reprodução dos nematoides dependem do estabelecimento de sítios de alimentação especializados na raiz da planta hospedeira e, por esse motivo, os nematoides não matam as células das quais se alimentam (ABAD, *et al.*, 2003). Para estabelecer essa relação de parasitismo, esses parasitas induzem a rediferenciação celular, que leva à formação de células multinucleadas denominadas sincício em NFC e células gigantes em NFG.

O sincício e as células gigantes possuem a mesma função de dar suporte nutritivo aos nematoides, mas diferem em estrutura e mecanismo de formação. O sincício é iniciado pelo juvenil de segundo estágio (J2) a partir de uma única célula procambial, do periciclo, da endoderme ou do parênquima cortical e se expande dentro ou ao longo do cilindro vascular através da dissolução da parede celular das células adjacentes. Isso resulta na formação de um único complexo multinuclear e hipertrofiado em contato próximo ao xilema e floema (FUDALI, *et al.*, 2008). Em contraste, os J2 do gênero *Meloidogyne* spp. selecionam de 5 a 7 células do parênquima que são induzidas a realizar várias mitoses sem citocinese para formar células grandes e multinucleadas, das quais os nematoides se alimentam (DE ALMEIDA ENGLER, *et al.*, 1999).

A formação de ambos os sítios de alimentação requer uma mudança substancial no desenvolvimento da raiz que surge de modificações extensivas no padrão de expressão gênica da planta hospedeira (GHEYSEN ;FENOLL, 2002). Esse processo é iniciado pelas secreções das células da glândula faríngea que são introduzidas nas primeiras células do sítio de alimentação pelo estilete. O estabelecimento e manutenção do sítio de alimentação são fundamentais para a sobrevivência dos nematoides endoparasitas (LILLEY, *et al.*, 2012).

O ciclo de vida dos NFG consiste de seis estágios fenológicos: ovo, quatro juvenis (J1, J2, J3 e J4) e fêmea (**Figura 1**). Os diferentes estágios são separados por ecdises, quando ocorre a substituição da cutícula. Um ciclo completo leva de 6 a 8 semanas, dependendo das condições ambientais. Depois de penetrar na zona de alongamento da raiz da planta hospedeira, o J2pp

usando força mecânica do estilete e degradação enzimática da parede celular e lamela média migra pelo cilindro vascular, modifica células vegetais, que são diferenciadas em sítios de alimentação. Estas células podem atingir um tamanho até 400 vezes maior que uma célula normal da raiz e apresentam cerca de cem núcleos poliplóides (VAN DER EYCKEN, *et al.*, 1996; GHEYSEN ;FENOLL, 2002). Após sucessivas ecdises, o J2 se diferencia em J3 e J4, assumindo uma forma salsichóide. Quando em condições desfavoráveis de parasitismo, o J4 se diferencia em macho adulto, vermiforme e abandona a raiz. Por outro lado, quando a interação molecular planta-nematoide é favorável, ocorre a diferenciação do J4 em fêmea adulta que completa seu ciclo de vida, geralmente um mês, depositando em torno de 2.000 ovos (WILLIAMSON ;GLEASON, 2003). A reprodução de *M. incognita* se dá exclusivamente por partenogênese mitótica, o que pode estar relacionado com a ampla gama de hospedeiros que a espécie apresenta (TRUDGILL ;BLOK, 2001).

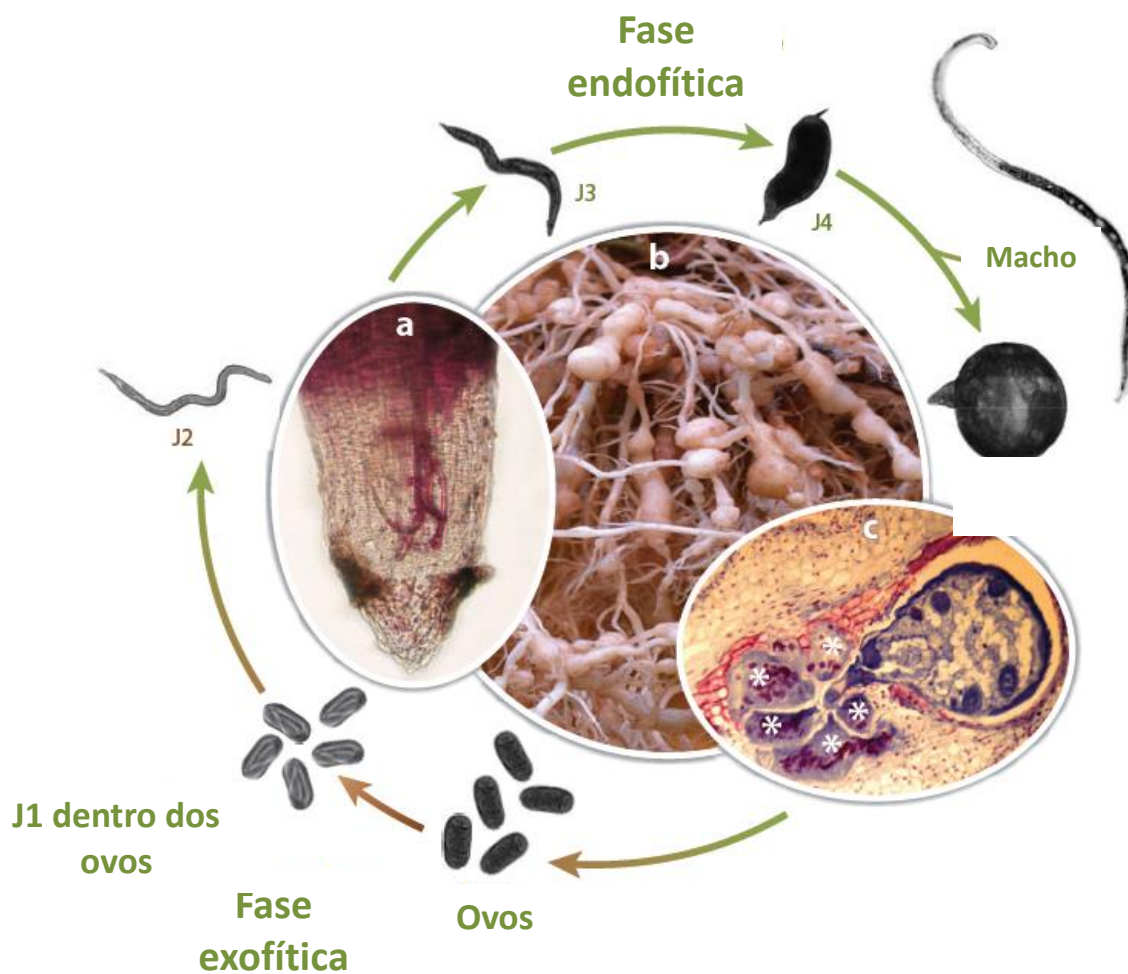


Figura 1. **Ciclo de vida do nematóide *Meloidogyne incognita*** (Adaptado de ABAD e colaboradores 2013) Devido à íntima e sofisticada interação molecular planta-nematoide os endoparasitas sedentários habitam o hospedeiro interna e permanentemente: (1) juvenil 2 eclode do ovo; (2) juvenil 2 migra no solo, localiza e invade raízes; (3) formação do sítio de alimentação e ecdise em juvenil 3; (4) ecdise em juvenil 4 e diferenciação de desenvolvimento, formando macho de vida livre em condições desfavoráveis ou fêmea adulta parasitas; (5) fêmea adulta deposita ovos em massa gelatinosa; (6) ovos são liberados no solo ou continuam na raiz original, completando o ciclo de vida.

1.3. Interferência mediada por RNA (RNAi)

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um fenômeno que ocorre naturalmente nas células em diversos organismos eucarióticos. É um processo altamente conservado, que promove o silenciamento de genes antes que ocorra sua tradução, via degradação do mRNA (OBBARD, *et al.*, 2009). Tal processo, descrito primeiramente em plantas, foi denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (JORGENSEN, *et al.*, 1996).

Em plantas, acreditava-se inicialmente que o mecanismo de RNAi era apenas utilizado como defesa contra efeitos da movimentação de transposons, ou ainda, contra infecção por vírus (VOINNET, 2001; WATERHOUSE, *et al.*, 2001). Entretanto, sabe-se que esse processo participa de forma integral na regulação da expressão gênica em várias plantas e outros eucariotos (LILLEY, *et al.*, 2007).

A primeira descrição de silenciamento gênico em animais, assim como sua melhor compreensão, foi obtida em *Caenorhabditis elegans*, nematoide de vida livre e organismo modelo (FIRE, *et al.*, 1998). Nesse estudo foi constatado que os efeitos dos RNAs dupla fita (dsRNA) nos nematoides puderam ser observados em células distantes e também na progênie, indicando que as células possuem um mecanismo de transporte. Diante disso, esses autores concluíram que o fenômeno de RNAi em nematoides é induzido por RNA dupla fita, sistêmico e hereditário.

A via de RNAi em nematoides apresenta um processamento inicial comum que se desdobra em quatro etapas funcionais (**Figura 2**) (ROSSO, *et al.*, 2009). Na fase inicial a molécula de RNA fita dupla é reconhecida pelo

complexo DICER (“dsRNA-specific RNase III-type endonuclease”). O domínio RNaseIII ATP-dependente desse complexo cliva o dsRNA em pequenos fragmentos de 21-25 pares de bases, denominados siRNAs (“small interfering” RNA). Esses siRNAs primários possuem grupos monofosfatados nas extremidades 5’ e dois pares de bases livres nas extremidades 3’ e são destinados aos quatro caminhos possíveis.

Primeiramente, os siRNAs são separados em fitas simples e somente a fita antisenso é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA, RISC (“RNA-induced silencing complex”). O complexo RISC, agora ativado, reconhece o transcrito alvo como resultado de um pareamento de bases entre o siRNA fita simples e o mRNA complementar. Por fim, o mRNA é clivado em vários fragmentos e, subsequentemente, degradado pela atividade exonucleásica do complexo RISC, levando ao silenciamento gênico. O segundo destino possível é conhecido como fase de amplificação do silenciamento. Algumas moléculas de siRNAs fita simples agem como iniciadores de polimerização, se ligando a uma enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Usando o mRNA como molde, a RdRp gera novas moléculas de dsRNA específicas, que re-iniciam a geração de mais siRNAs, amplificando exponencialmente o efeito de silenciamento gênico. Os siRNAs são mais eficientes na indução do silenciamento, possivelmente devido a sua associação com proteínas argonautas, em particular CSR-1 que tem destacada atividade “slicer” (AOKI, *et al.*, 2007). O terceiro destino é a migração das moléculas de siRNA para células vizinhas, o que leva a uma resposta sistêmica do silenciamento gênico. O quarto destino dos siRNA é o núcleo, onde modificações na cromatina acarretam em silenciamento gênico

pré-transcricional, podendo ter efeito hereditário em função de alterações epigenéticas.

Nos últimos anos, com o advento da disponibilização do genoma de diversas espécies, aconteceu um amplo crescimento nas aplicações dessa metodologia para o entendimento da função gênica tanto em animais quanto em plantas. Dessa forma, essa técnica vem sendo muito utilizada para estudos de genômica funcional e também para manipulação da expressão de genes-alvo.

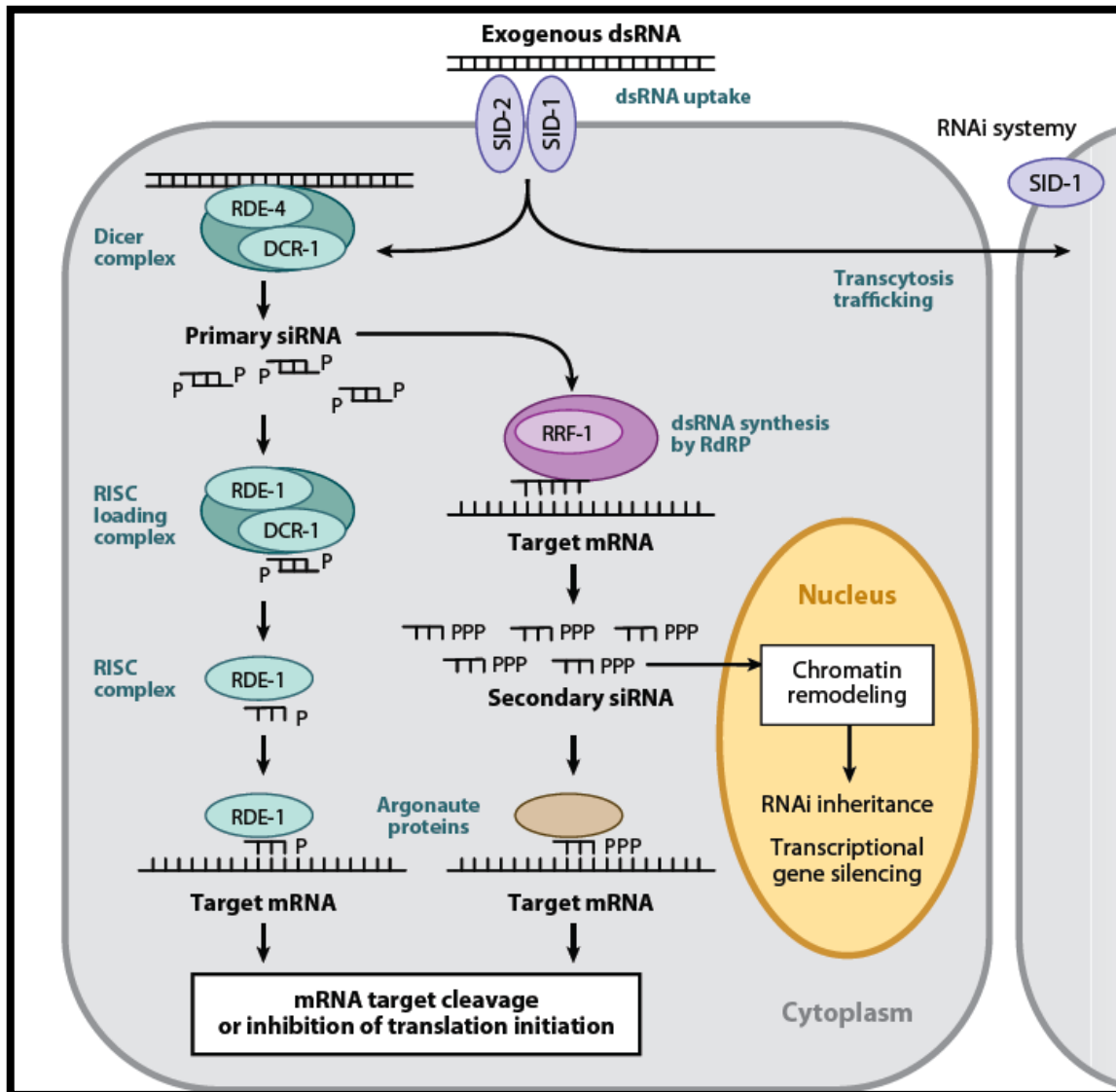


Figura 2. Via de geração de siRNAs e silenciamento gênico. O complexo DICER se liga aos dsRNAs que são clivados em fragmentos de 21-25 pb. Esses siRNAs possuem quatro destinos: são acoplados ao complexo RISC ativando o mesmo, que leva ao reconhecimento do mRNA alvo e sua posterior degradação; servem de iniciadores para geração de novas moléculas de dsRNAs por RdRPs; são transportados para o núcleo desencadeando o silenciamento a nível transcricional ou são transportados de célula em célula através do complexo transmembrânico SID-1, desencadeando o silenciamento sistêmico. Figura retirada de ROSSO *et al.*, 2009.

1.4. O uso do RNAi em plantas de interesse comercial

O desenvolvimento da técnica de RNA interferente permitiu o entendimento sobre a função de certos genes e a regulação dos mesmos associados a diferentes vias metabólicas que controlam características importantes e, por conseguinte, levou obtenção de plantas transgênicas para determinada característica desejada (KATOCH ;THAKUR, 2013). Em plantas, a interferência mediada por RNA é induzida pela introdução de vetores que transcrevem uma fita dupla de RNA (dsRNA) (HORIGUCHI, 2004). A escolha da metodologia de transformação é um dos fatores cruciais para o sucesso em plantas. Dentre elas, a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* é a mais utilizada, além de bombardeamento e eletroporação. Os efeitos do silenciamento do RNA podem ser modulados dependendo da arquitetura da construção utilizada. Essas construções geralmente possuem uma região espaçadora ou íntron entre duas sequências invertidas repetidas e o transcrito resultante forma uma estrutura em forma de grampo, denominada hpRNA (hairpin RNA = grampo de RNA) (HIRAI, *et al.*, 2007). As construções contendo íntron se mostraram mais eficientes do que utilizando apenas uma região espaçadora (SMITH, *et al.*, 2000). Normalmente, essa sequência GENE-ÍNTRON-GENE é inserida a jusante de um promotor que pode ser o 35S em dicotiledôneas, Ubiquitina em monocotiledôneas ou outro promotor específico no caso de outro organismo alvo.

A metodologia de RNAi tornou-se uma ferramenta importante na melhoria de diversas características agrônômicas (**Tabela 1**). O nível de componentes nutricionais desejados tem sido manipulado com sucesso em algumas plantas de interesse comercial (KATOCH ;THAKUR, 2013). Dentre

eles destacam-se: aumento dos níveis de ácidos graxos insaturados (LIU, *et al.*, 2002) redução de gossipol em sementes de algodão (SUNILKUMAR, *et al.*, 2006), arroz com baixos níveis de glutelina (KUSABA, *et al.*, 2003), aumento de carotenoides e flavonoides em tomate (DAVULURI, *et al.*, 2005), trigo com maior nível de amilose (REGINA, *et al.*, 2006), diminuição dos níveis de cafeína em café (OBBARD, *et al.*, 2009) e uma cebola que não causa lacrimejamento dos olhos (EADY, *et al.*, 2008).

Tabela 1. Melhoria de características importantes em plantas via RNAi (Adaptado de Katoch and Thakur, 2012)

Planta	Gene-alvo	Característica obtida	Vantagens obtidas	Referência
<i>Arabidopsis</i>	<i>ACR2</i>	Aumento da absorção de arsênico	Fitorremediação de metais pesados do solo	(DHANKHER, <i>et al.</i> , 2006)
<i>Arabidopsis</i>	<i>MS1</i>	Degeneração do tapetum	Esterilidade masculina	(WILSON, <i>et al.</i> , 2001)
Café	CaMxMt1	Redução de cafeína	Café descafeinado	(OGITA, <i>et al.</i> , 2004)
Algodão	ghSAD1/ghSDA2	Aumento do ácido esteárico e oléico em sementes	Benefícios para aplicações na cozinha	(LIU, <i>et al.</i> , 2002)
Algodão	Δ -cadineno sintase	Redução no gossipol	Benefícios na saúde	(SUNILKUMAR, <i>et al.</i> , 2006)
Milho	Ramificação amido	Aumento do conteúdo de amilose	Qualidade superior do milho	(CHAI, <i>et al.</i> , 2005)
Milho	Ms45	Esterilidade masculina	Linhagens estéreis de milho	(CIGAN, <i>et al.</i> , 2005)
Milho	Opaque2	Redução dos níveis de leucina	Aumento no conteúdo de lisina	(SEGAL, <i>et al.</i> , 2003)
Cebola	LFS	Redução do fator lacrimal	Cebola que não causa lacrimejamento	(EADY, <i>et al.</i> , 2008)
Petúnia	CHS	Biosíntese de antocianina	Melhoria do valor de mercado	(MUIR, <i>et al.</i> , 2001)
Petúnia	TAZ1	Degeneração do tapetum	Esterilidade masculina	(KAPOOR, <i>et al.</i> , 2002)
Arroz	Lgc1	Baixo nível de glutelina	Benefícios na saúde	(KUSABA, <i>et al.</i> , 2003)
Fumo	CHI	Mudança na cor da flor	Maior variedade de plantas ornamentais	(NISHIHARA, <i>et al.</i> , 2005)
Tomate	DET1	Aumento do conteúdo de carotenoides e flavonóides	Benefícios na saúde	(DAVULURI, <i>et al.</i> , 2005)
Trigo	SBEIIa/SBEIIb	Aumento da quantidade de amilose	Benefícios na saúde	(REGINA, <i>et al.</i> , 2006)

As doenças causadas em plantas por vírus, insetos, fungos e bactérias geram danos de grande proporção para o cultivo de variedades de interesse comercial e ornamentais. Um número grande de resistência transgênica a vírus já foi reportado, isso inclui metodologias para o controle de vírus de fita simples de DNA, como os geminivírus e vírus de RNA, como os potivírus. São exemplos: mandioca resistente ao ACMV (ZHANG, *et al.*, 2005), batata resistente a PVY (WATERHOUSE, *et al.*, 1998), fumo resistente a PMMoV e AMV (TENLLADO, *et al.*, 2003), TMV (ZHAO, *et al.*, 2006).

Tabela 2. Resistência a vírus em plantas mediada por RNAi (Adaptado de Katoch and Thakur, 2012)

Planta	Vírus	Material genético	Resultados	Referência
Mandioca	ACMV	DNA	Aumento da resistência ao ACMV	(ZHANG, <i>et al.</i> , 2005)
Batata	PVY	RNA	Imunidade ao vírus	(WATERHOUSE, <i>et al.</i> , 1998)
Fumo	PMMoV	RNA	Redução da infecção viral	(TENLLADO, <i>et al.</i> , 2003)
Fumo	TMV	RNA	Inibição da replicação	(ZHAO, <i>et al.</i> , 2006)
Fumo	AMV	RNA	Redução da infecção viral	(WATERHOUSE, <i>et al.</i> , 1998)
Tomate	Vírus do enrolamento da folha da batata	DNA	Resistência ao vírus	(NORIS, <i>et al.</i> , 2004)
Tomate	TYLCV C1	RNA	Resistência à infecção	(BENDAHMANE ;GRONENBORN, 1997)
Feijão da Índia	MYMIV	DNA	Recuperação da infecção	(POOGGIN, <i>et al.</i> , 2003)

O uso de RNAi para o controle de insetos vem sendo bastante visado e vem gerando muitos resultados promissores, tanto por meio microinjeção como por suplementação de dsRNA em dieta. O silenciamento gênico foi obtido em muitas espécies de insetos com importância para a agricultura, como por exemplo: vitelogenina em *Apis mellifera* (NUNES ;SIMOES, 2009) e *Schistocerca gregária* (BADISCO, *et al.*, 2011); subunidade E da VATPase de *Tribolium castaneum* (WHYARD, *et al.*, 2009); acetilcolina esterase em

Helicoverpa armigera (KUMAR, *et al.*, 2009); Citocromo P450 de *Spodoptera frugiperda* (GRIEBLER, *et al.*, 2008).

Resultados recentes mostraram a eficiência de plantas transgênicas expressando dsRNA para o controle de insetos-praga. Dois trabalhos mostraram que plantas transgênicas expressando dsRNA genes essenciais do trato digestivo dos insetos causou a morte dos mesmos 24 h após o contato com o dsRNA (BAUM, *et al.*, 2007; MAO, *et al.*, 2007). Essas plantas mostraram resistência aumentada contra duas pragas importantes da agricultura, a lagarta *Helicoverpa armigera* e a praga da raiz do milho *Diabrotica virgifera virgifera*. Eventos de milho GM expressando dsRNA da subunidade A da VATPase foram gerados e, ao serem submetidos ao ataque do inseto, as plantas apresentaram um nível de danos significativamente menor quando comparadas com as plantas não transgênicas. Recentemente, Mao e colaboradores (2011) transformaram plantas de algodão para expressão do dsRNA do gene *CYP6AE14* que codifica o citocromo P450. Eles observaram que as lagartas, quando submetidas às plantas, apresentaram desenvolvimento retardado e, além disso, as plantas transgênicas apresentaram menos danos quando comparadas as plantas convencionais.

Tabela 3. Genes silenciados em insetos

Inseto alvo	Método de entrega	Concentração dsRNA	Gene alvo	Percentual de mortalidade	Referência
<i>Diabrotica virgifera Virgifera</i>	Dieta artificial	2-5 ng/cm ²	subunidades da vATPase	80-95	(BAUM, <i>et al.</i> , 2007)
<i>Diabrotica undecimpunctata howardii</i>	Dieta artificial	780 ng/cm ²	subunidades da vATPase	45	(BAUM, <i>et al.</i> , 2007)
<i>Leptinotarsa Decemlineata</i>	Dieta artificial	52 ng/cm	subunidades da vATPase	90	(BAUM, <i>et al.</i> , 2007)
<i>Tribolium castaneum</i>	Dieta artificial	0.003mg/g	vATPase E	70	(WHYARD, <i>et al.</i> , 2009)
<i>Drosophila spp</i>	Microinjeção	0.2-0.6 mg/ml	vATPase E e tubulina	40-70	Whyard <i>et al.</i> , 2009
<i>Glossina morsitans Morsitans</i>	Microinjeção	435 ng/μl	tsetse-EP	40	(WALSHE, <i>et al.</i> , 2009)
<i>Acyrtosiphon Pisum</i>	Dieta artificial	0.003mg/g	vATPase E	60	(WALSHE, <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Microinjeção	1 μg/μl	nitroporina 2	N.R.	(PRICE ;GATEHOUSE, 2008)
<i>Reticulitermes flavipes</i>	Dieta artificial	15.3 μg/cm ² 6.6 μg/cm ²	celulase hexamerina 2	75 45	(ZHOU, <i>et al.</i> , 2008)
<i>Epiphyas postvittana</i>	Microinjeção	1 μg	proteína de ligação a carboxilesterase	N.R.	(TURNER, <i>et al.</i> , 2006)
<i>Helicoverpa armigera</i>	Dieta artificial	3 mg/g	citocrome P450	N.R.	(MAO, <i>et al.</i> , 2007)
<i>Manduca sexta</i>	Dieta artificial	0.01mg/g	vATPase E	50	(WHYARD, <i>et al.</i> , 2009)
<i>Plutella xylostella</i>	Microinjeção	662-824 μg/μl	citocrome P450	90	(BAUTISTA, <i>et al.</i> , 2009)
<i>Apis mellifera</i>	Microinjeção	10 μg	vitelogenina		(NUNES ;SIMOES, 2009)
<i>Helicoverpa armigera</i>	Dieta artificial	25-50 nM	acetilcolina esterase		(KUMAR, <i>et al.</i> , 2009)
<i>Schistocerca gregaria</i>	Microinjeção	5 μg	vitelogenina		(BADISCO, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Dieta	0.4 mg	citocromo 450		(GRIEBLER, <i>et al.</i> , 2008)

A pesquisa para conferir resistência a fungos e bactérias via RNAi é mais escassa. O silenciamento de dois genes de *Agrobacterium tumefaciens*, *iaaM* and *ipt*, diminuíram a formação de tumores da galha da coroa em *Arabidopsis* (ESCOBAR, *et al.*, 2001). Em arroz (*Oryza sativa*), o silenciamento de genes envolvidos na resposta imune inata mostrou resistência ao fungo *Magnaporthe grisea* e à bactéria *Xanthomonas oryzae* (THAO, *et al.*, 2007).

1.5. O uso do RNAi *in planta* para o controle de fitonematoides

A técnica de silenciamento gênico via RNAi vem sendo muito utilizada em plantas, nematoides e outros organismos como ferramenta de genética reversa para análise da função de diversos genes, observado pelo fenótipo de sua ausência ou redução de expressão.

Apesar dos efeitos do silenciamento gênico terem sido frequentemente observados em nematoides parasitas de plantas, os detalhes moleculares desse mecanismo ainda não foram elucidados. Essa situação tende a melhorar visto que genomas de diversos nematoides estão sendo gerados e, conseqüentemente, os possíveis genes componentes das vias de silenciamento podem ser identificados baseados em homologia com o nematoide modelo *C. elegans* (LILLEY, *et al.*, 2012).

No caso específico de nematoides parasitas de plantas, a metodologia de “soaking”, que é a incubação de ovos ou juvenis de segundo estágio com dsRNA para subsequente infecção de plantas para testes *in vivo*, vem sendo muito utilizada. Vários genes-alvo que foram silenciados utilizando essa metodologia demonstraram um alto potencial de intervenção do parasitismo por fitonematoides como: genes de proteinases silenciados em nematoides de cistos, *Heterodera glycines* e *Globodera pallida* (URWIN, *et al.*, 2002) e nematoide de galha *M. incognita* (SHINGLES, *et al.*, 2007); de quitina sintase em *M. artiellia* (FANELLI, *et al.*, 2005); de aminopeptidase em *H. glycines*; de celulases em *G. rostochiensis* e *H. glycines* (LILLEY, *et al.*, 2005); de proteína de secreção anfideal em *G. rostochiensis* (CHEN, *et al.*, 2005); de peptídeos FMRF-like em *G. pallida* (KIMBER, *et al.*, 2007); de pectato liase, corismato

mutase e peptídeo de secreção SYV46 em *H. glycines* (BAKHETIA, *et al.*, 2007); e de oxidase dupla em *M. incognita* (BAKHETIA, *et al.*, 2005). Entretanto, essa metodologia mostrou-se pouco duradoura visto que a administração do dsRNA ocorre em um único momento e, após um tempo curto, há uma recuperação da expressão do gene-alvo.

Alternativamente, o uso da estratégia de produção de dsRNA *in planta* vem mostrando alta eficácia, tanto para NFG quanto para NFC, pois diversos estudos demonstraram resultados extremamente promissores (**Tabela 4**). Os sítios de alimentação dos fitonematoides endoparasitas promovem uma rota ideal para a entrega de dsRNAs aos nematoides (**Figura 3**). As plantas podem ser geneticamente modificadas para expressarem dsRNAs através de um vetor binário contendo o fragmento gênico de interesse clonado senso e antisenso separados por um íntron ou por uma região espaçadora. Os dsRNAs produzidos podem ser processados em siRNAs pela DICER, no entanto, ainda não é de conhecimento se esse processamento ocorre ainda na planta, dentro do próprio nematoide ou em ambos (GHEYSEN ;VANHOLME, 2007). À medida que o nematoide se alimenta da planta durante seu desenvolvimento há uma entrega contínua de dsRNA/siRNA durante todo o ciclo de vida.

Tabela 4. Genes-alvo de fitonematoides controlados efetivamente por RNAi. Adaptado de (LI, *et al.*, 2011).

Nome de acesso/ nº de acesso GenBank	Próvel função do gene-alvo	Espécie de nematoide	Método de ingestão	Fenótipo e percentagem de redução	Referência
Hgctl, AF 498	C-Type lectin	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ 41% no nº de nematoides estabelecidos	(URWIN, <i>et al.</i> , 2002)
Hgcp-I	Cysteine proteinase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ 40% no nº de nematoides estabelecidos	(URWIN, <i>et al.</i> , 2002)
pMiDuoX1, DQ082753	Dual oxidase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓ de até 70% no nº de nematoides estabelecidos e diminuição da fecundidade	(BAKHETIA, <i>et al.</i> , 2005)
Gr-eng-1, AF004523	β-1,4 endoglucanase	<i>G. rostochiensis</i>	Soaking	↓ ~50% no nº de nematoides estabelecidos	(CHEN, <i>et al.</i> , 2005)

Gr-ams-1, AJ270995	pharyngeal Secreted amphid protein	<i>G. rostochiensis</i>	Soaking	Reduzida habilidade de localizar e penetrar raízes	(CHEN, <i>et al.</i> , 2005)
AY013285	Chitin synthase	<i>M. artiellia</i>	Soaking	Atraso na eclosão dos ovos	(FANELLI, <i>et al.</i> , 2005)
hg-amp-1, AY883023	Amino peptidase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ 61% no nº de fêmeas reprodutivas	(LILLEY, <i>et al.</i> , 2005)
16D10, DQ841121-DQ841123	Secreted peptide	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓ 74%-81% de diminuição de nematoides estabelecidos	(HUANG, <i>et al.</i> , 2006)
hg-rps-23, BF014259	Ribosomal protein	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ da viabilidade de J2	(ALKHAROUF, <i>et al.</i> , 2007)
hg-eng-1, AF006052	β-1,4 endoglucanase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ do nº de nematoides estabelecidos	(BAKHETIA, <i>et al.</i> , 2007)
hg-syv46, AF273728	Secreted peptide SYV46	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ do nº de nematoides estabelecidos	(BAKHETIA, <i>et al.</i> , 2007)
Mi-gsts-1, EL784458	Glutathione-S transferase	<i>M. incognita</i>	Soaking	52% -71% ↓ fecundidade	(DUBREUIL, <i>et al.</i> , 2007)
Flp	FMRF amide-like peptides	<i>G. pallida</i>	Soaking	Inibição da Mobilidade	(KIMBER, <i>et al.</i> , 2007)
Mi-cpl-1	Cysteine proteinase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓ 60% no nº de nematoides estabelecidos	(SHINGLES, <i>et al.</i> , 2007)
AW871671	Integrase	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓ >90% de nematoides estabelecidos	(YADAV, <i>et al.</i> , 2006)
AW828516	Splicing factor	<i>M. incognita</i>		↓ >90% de nematoides estabelecidos	(YADAV, <i>et al.</i> , 2006)
16D10, DQ841121-DQ841123	Secreted peptide	<i>M. arenaria, M. incognita, M. javanica, M. hapla</i>	<i>In planta</i>	↓ 63%-90% no nº e tamanho de galhas	(HUANG, <i>et al.</i> , 2006)
MSP	Major sperm protein	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ de até 68% no nº de ovos	(STEEVES RM, 2006)
Hg-rps-3a, CB379877	Ribossomal protein 3a	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 87% de cistos(fêmeas)	(KLINK, <i>et al.</i> , 2009)
Hg-rps-4, CB278739	Ribossomal protein 4	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 81% de cistos(fêmeas)	(KLINK, <i>et al.</i> , 2009)
Hg-spk-1, BI451523.1	Spliceosomal SR protein	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 88% de cistos(fêmeas)	(KLINK <i>et al.</i> , 2009)
Hg-snb-1, BF014436	Synaptobrevina	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 93% de cistos(fêmeas)	(KLINK <i>et al.</i> , 2009)
4G06, AF46060	Ubiquitin-like	<i>H. schachtii</i>		↓ 23%-64% de fêmeas em desenvolvimento	(SINDHU, <i>et al.</i> , 2009)
3B05, AF469058	Cellulose binding protein	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓ 12%-47% de fêmeas em desenvolvimento	(SINDHU, <i>et al.</i> , 2009)
8H07, AF502391	SKP1-like	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓ >50% de fêmeas em desenvolvimento	(SINDHU, <i>et al.</i> , 2009)
10A06, AF502	Zinc finger protein	<i>H. schachtii</i>		↓ 42% de fêmeas em desenvolvimento	(SINDHU, <i>et al.</i> , 2009)
Y25, CB824330	Beta subunit of the COPI complex	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 81% de ovos	(LI, <i>et al.</i> , 2010a; LI, <i>et al.</i> , 2010b)
Prp-17, AF113915	Pre-mRNA splicing factor	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 79% de ovos	(LI, <i>et al.</i> , 2010a)
Cpn-1, GU074018	Unknow protein	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 95% de ovos	(SINDHU, <i>et al.</i> , 2009)
Peptídeo FMRF	Neuropeptídeo	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓ 50%-80% na fecundidade	(PAPOLU, <i>et al.</i> , 2013)
Cisteino, Serino e Aspártico	Protease	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓ tamanho das fêmeas ↓ 30% de ovos	(ANTONINO DE SOUZA JUNIOR, <i>et al.</i> , 2013)

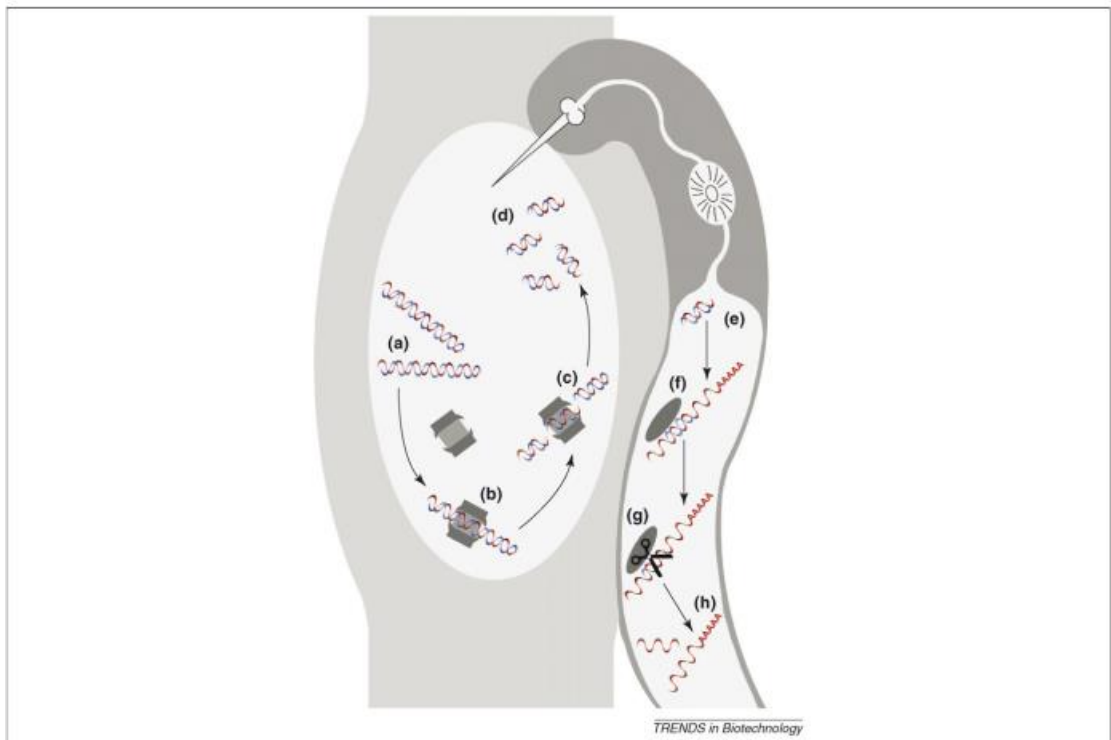


Figura 3. **Representação esquemática do mecanismo de RNAi em *Meloidogyne incognita*.** O juvenil de segundo estágio perfura a célula com seu estilete, ingere siRNAs produzidos pela planta geneticamente modificada, quando se alimenta e, a partir do tubo digestivo, ocorre o silenciamento do gene alvo. Figura retirada de GHEYSEN e VANHOLME, 2007.

Análises feitas em plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando dsRNA do gene de parasitismo 16D10 de *M. incognita* mostraram diminuição variando entre 63% e 90% no número de galhas e redução correspondente na produção de ovos. Nesse mesmo experimento, o alto grau de homologia das sequências do gene 16D10 entre as diferentes espécies de *Meloidogyne* gerou resistência contra *M. javanica*, *M. hapla* e *M. arenaria* (HUANG, *et al.*, 2006). Plantas de tabaco expressando dsRNA dos genes fator de splicing e integrase apresentaram alto nível de resistência, com 90% de redução no número de

ovos por grama de raiz (YADAV, *et al.*, 2006). Outros quatro genes de *M. incognita*, sendo eles proteína precursora de estresse mitocondrial 70, precursor beta da cadeia mitocondrial da ATP sintase e L-lactato desidrogenase tiveram seus dsRNAs expressos em raízes quiméricas de soja, sendo que dois apresentaram 90% menos galhas (IBRAHIM, *et al.*, 2011). Resistência parcial foi obtida quando o gene da enzima dual oxidase, envolvida na formação da cutícula do nematoide, e o gene de uma sinal peptidase, um complexo proteico envolvido no processamento de proteínas secretadas, foram usados como alvo para o silenciamento (CHARLTON, *et al.*, 2010). Plantas transgênicas de fumo expressando dsRNA para os genes codificadores das proteinases cisteínica, aspártica e serínica mostraram uma redução no número de ovos por grama de raiz variando de 29 a 37% e redução de 27% na eclosão dos juvenis de segundo estágio oriundos desses ovos coletados (ANTONINO DE SOUZA JUNIOR, *et al.*, 2013).

O sucesso da técnica de RNAi *in planta* pode depender de vários fatores, como por exemplo, o uso de um promotor capaz de gerar um nível de expressão satisfatório e também o perfil de expressão do gene-alvo. Existem evidências que sugerem que um alto nível de expressão de dsRNA é requerido para que haja silenciamento gênico nos nematoides que estão se alimentando (FAIRBAIRN, *et al.*, 2007).

De acordo com os estudos realizados, aparentemente, a técnica de RNAi *in planta* é mais eficiente quando o gene-alvo selecionado está envolvido em processos celulares essenciais. Os genes de parasitismo apresentaram resultados significativos, no entanto, não persistentes. Isso provavelmente ocorre porque existem vários genes homólogos e podem possuir função

redundante por fazerem parte de famílias gênicas (DALZELL, *et al.*, 2011). Nesse contexto, os genes-alvo Isocitrato Liase e *hsp90* foram selecionados para o presente trabalho por estarem envolvidos em processos essenciais no metabolismo do nematoide *M. incognita* e apresentarem fenótipos letais no nematoide *C. elegans*.

1.6. Isocitrato Liase

Os nematoides de segundo estágio (J2pp) possuem um desenvolvimento lento e duradouro, podendo sobreviver no solo por longos períodos sem se alimentar. Esses juvenis pré-parasitas utilizam suas reservas lipídicas, geralmente encontradas em forma de grânulos (**Figura 4**), para manutenção de seu metabolismo (BIRD, 2003).



Figura 4. **Juvenil de segundo estágio de *Meloidogyne incognita***. As setas indicam uma grande concentração de grânulos de lipídeos, que são essenciais para sobrevivência do nematoide fora da planta hospedeira. Figura retirada de BIRD e KALOSHIAN, 2003.

O ciclo do glioxilato (**Figura 5**), via metabólica que ocorre geralmente em plantas e microrganismos e gera carboidratos a partir de lipídeos, está presente nesses nematoides, que provavelmente são os únicos seres do Reino Animalia que o utilizam (MCCARTER, *et al.*, 2003). Nessa via, o acetil-CoA oriundo da beta-oxidação de ácidos graxos, se condensa com o oxaloacetato para formação de citrato que, subseqüentemente, é convertido à isocitrato da mesma forma que no ciclo de Krebs. A diferença entre os dois ciclos aparece no processamento do isocitrato. No ciclo do glioxilato, o isocitrato é clivado pela Isocitrato Liase (IL), gerando succinato e glioxilato. O glioxilato, por sua vez, se condensa com uma nova molécula de acetil-CoA, reação catalisada pela enzima malato sintase, que leva à formação de malato, posteriormente convertido em oxaloacetato, iniciando um novo ciclo. Cada volta no ciclo consome duas moléculas de acetil-CoA e gera uma molécula de succinato. O succinato entra no ciclo de Krebs e gera oxaloacetato, que é convertido até fosfoenolpiruvato, um precursor da gliconeogênese. Portanto, o ciclo de glioxilato permite a conversão de acetil-CoA, ou seja, de ácidos graxos, em glicose. Os nematoides, aparentemente, utilizam essa via para sobrevivência durante o período em que ficam no solo sem se alimentar e necessitam de energia.

Em *C. elegans*, um gene homólogo a Isocitrato Liase, denominado icl-1 é requerido para que ocorra desenvolvimento embrionário normal e regula a longevidade dos nematoides. Sabe-se que esse gene age “downstream” na via da proteína DAF-16, um fator de transcrição da família FOXO, que influencia na taxa de longevidade em resposta à sinalização da interação da insulina com o fator de crescimento IGF-I (MURPHY, *et al.*, 2003). Além disso, ICL-1 interage

com a proteína GEX-3, que é homóloga à HEM-2 de humanos, responsável pelo desenvolvimento embrionário (SOTO, *et al.*, 2002). Uma EST codificadora de Isocitrato Liase já havia sido identificada em J2 de *M. incognita* (MCCARTER, *et al.*, 2003), além de um cDNA completo de Isocitrato Liase isolado de *M. javanica* (gi|15003598|). O isolamento do fragmento gênico de Isocitrato Liase para sua utilização como gene alvo foi planejado pelo fato de ele pertencer à classe de genes essenciais para o nematoide modelo *C.elegans* e, portanto, ser um bom candidato para silenciamento gênico *in planta*.

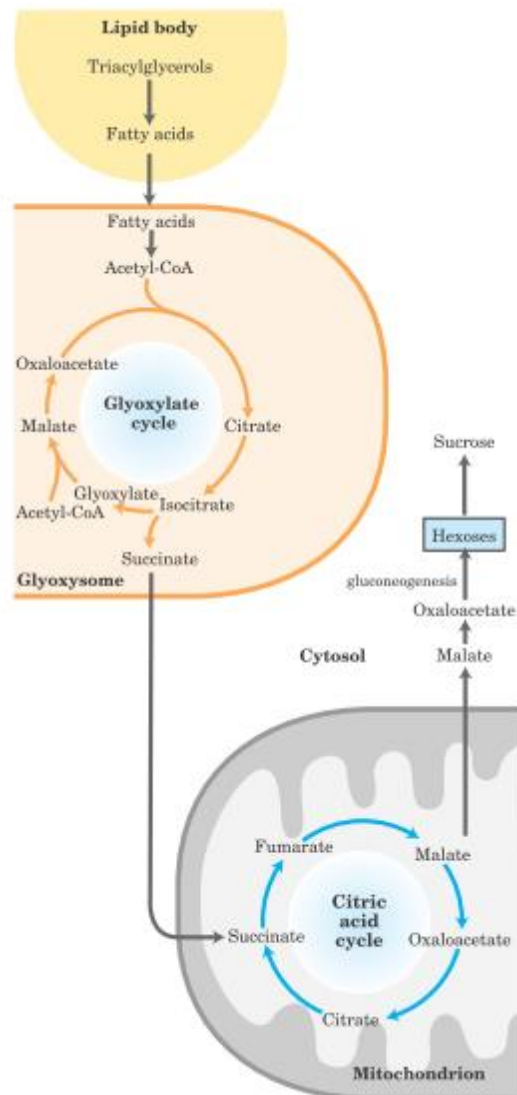


Figura 5. **Integração entre o ciclo do glioxilato (CG) e o ciclo de krebs (CK).** As reações do ciclo do glioxilato (glioxissomo) e do ciclo de krebs (mitocôndria) acontecem simultaneamente. O succinato gerado no CG sai do glioxissomo, entra na mitocôndria e participa do CK, aonde vai ser convertido a malato. O malato é transportado para fora da mitocôndria, é convertido à oxaloacetato que, por fim, entra na via de gliconeogênese. Figura retirada de LEHNINGER *et al*, Principles of Biochemistry, 2005.

1.7. Proteína de choque térmico 90 (HSP90)

Atualmente, sabe-se que a HSP90 está envolvida na modulação de muitas proteínas e vias de sinalização, além interagir com uma gama de co-chaperonas . A proteína de choque térmico 90 é ATP dependente e requerida para muitas funções celulares, como por exemplo, ativação e regulação de receptores de esteróides, proteínas kinases, diversos fatores de transcrição, além de participar do transporte vesicular e regulação da telomerase (PEARL ;PRODROMOU, 2006). Para que ocorra o processamento dessas proteínas é necessário que ocorra hidrólise de ATP em uma reação cíclica. A hidrólise do ATP induz mudanças conformacionais na HSP90, que rearranja seus domínios. Essa mudança influencia a interação com as proteínas substratos, ativando e estabilizando as mesmas (HESSLING, *et al.*, 2009). Essa proteína vem sendo estudada em diversos organismos e, enquanto em bactérias ela não é essencial, a mesma é indispensável em leveduras e outros eucariotos.

No nematoide modelo *C. elegans* a proteína DAF-21, homóloga a HSP90, é crítica para o desenvolvimento das gônadas e vulva assim como para a maturação dos oócitos (GILLAN, *et al.*, 2009). Essa proteína é predominantemente expressa nas células germinativas (INOUE, *et al.*, 2003), entretanto, observou-se que a proteína HSP90 também é crucial em nematoides adultos, já que após a ingestão do dsRNA específico houve, além da morte embriogênica da progênie, o cessamento da produção de ovos (PIANO, *et al.*, 2000). O silenciamento do gene *daf-21* realizado em ovos de *C. elegans* resultou em morte precoce do J1 (RIDDLE, 1999), defeitos severos na oogênese, esterilidade e morte embriogênica (PIANO, *et al.*, 2000). O silenciamento de *daf-21* em larvas de *C. elegans* afetou as células musculares

e comprometeu a motilidade das mesmas (GAISER, *et al.*, 2011). A inibição da atividade de HSP90, utilizando um potente inibidor específico (geldanamicina) demonstrou um efeito letal em *Brugia pahangi*, nematoide parasita de humano. Esse tratamento causou interrupção da produção de ovos, morte embrionária e morte de nematoides adultos (DEVANEY, *et al.*, 2005b).

Estudos demonstraram que em *Drosophila melanogaster* a inibição de HSP90 gerou uma variedade de fenótipos, incluindo patas e olhos deformados, anormalidades nas asas, tórax e cerdas (RUTHERFORD ;LINDQUIST, 1998). Em vertebrados essa proteína está relacionada com a formação de estruturas musculares. Especificamente, a deleção do gene *hsp90a.1* em embriões de peixe-zebra afeta a formação da ultra-estrutura miofibrilar (DU, *et al.*, 2008).

O gene *hsp90* foi escolhido para silenciamento por estar descrito como gene essencial em nematoides de vida livre e nematoides parasitas (GILLAN, *et al.*, 2009) e pelo fato de vários estudos, envolvendo diversos organismos, mostrarem efeito deletério e significativo principalmente no desenvolvimento embrionário e formação de estruturas musculares.

2- HIPÓTESE

Os genes Isocitrato Liase e *hsp90* estão envolvidos em mecanismos de estresse desempenhando função essencial e são alvos interessantes para o controle deste fitonematoide. Plantas geneticamente modificadas para expressar dsRNA desses genes podem apresentar resistência ao fitonematoide *Meloidogyne incognita*.

3- JUSTIFICATIVA

O nematoide *Meloidogyne incognita* é considerado um dos maiores fitopatógenos mais danosos da agricultura mundial. Esses fitonematoides possuem distribuição geográfica ampla, altas taxas de reprodução e vasta gama de hospedeiros. Os métodos de controle utilizados atualmente são inadequados e evidencia que o uso de novas tecnologias fornecerá uma solução benéfica para o meio ambiente, produtor e consumidor. A compreensão das interações entre a planta e o nematoide é uma etapa essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes. Os genes essenciais para o metabolismo são cruciais para o sucesso do parasitismo e desenvolvimento de *M. incognita* e, portanto, têm grande potencial para uso em estudos de validação funcional para desvendar os papéis específicos desses genes na interação planta-nematoide. O desenvolvimento de variedades comerciais resistentes poderá aumentar a produtividade de culturas como soja, algodão, café, milho entre outras. Além disso, poderá reduzir consideravelmente o uso de nematicidas o que irá diminuir os danos causados no meio ambiente e também para os agricultores.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar a capacidade dos genes Isocitrato Liase e *hsp90* em alterar o desenvolvimento e sucesso reprodutivo do nematoide *Meloidogyne incognita*, através da técnica de RNA interferente (RNAi) em plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum*).

4.2. Objetivos Específicos

- Quantificar por qRT-PCR o acúmulo de transcritos de cada gene estudado nos diferentes estádios de vida de *M. incognita*;
- Localizar a expressão dos genes-alvo através de hibridização *in situ* whole-mount em Juvenis de segundo estágio pré-parasitas;
- Isolar e subclonar os fragmentos dos genes estudados em vetor binário e transformar *N. tabacum* para expressão de RNA dupla fita (dsRNA) *in planta*;
- Realizar teste de resistência das plantas transgênicas expressando dsRNA infectadas por *M. incognita*;
- Verificar se existem diferenças morfológicas entre as células gigantes das plantas controle e das plantas transgênicas expressando dsRNA após infecção com *M. incognita*
- Avaliar o silenciamento dos genes-alvo por qRT-PCR nos ovos de nematoides coletados das plantas expressando dsRNA;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cultura de Nematoides

O fitonematoide endoparasita *M. incognita*, raça 3, foi inoculado em *Solanum lycopersicum* (tomateiro), das variedades Santa Cruz e Kada Gigante. Objetivando a multiplicação e a manutenção desses nematoides, as sementes de tomateiro foram germinadas em bandeja, transferidas após duas semanas para sacos plásticos de 20 L com solo autoclavado. Quando atingiram de 30 a 40 centímetros de altura, os tomateiros foram infectados com nematoides. A partir de 28 dias após infecção (dpi), as raízes apresentaram galhas e os nematoides foram coletados nas diferentes fases de vida.

5.2. Extração de Ovos

Os tomateiros infectados apresentando galhas em suas raízes foram retirados dos sacos. O sistema radicular passou por uma limpeza em água corrente para a retirada de solo. Em seguida, as raízes foram trituradas no liquidificador com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) e o material resultante separado em peneiras de 100 e 400 mesh. O hipoclorito de sódio dissolve a massa proteica que mantém os ovos aglomerados, facilitando sua coleta. A fração coletada na peneira de 400 mesh foi misturada com caulim (substrato inerte de gesso) e centrifugada a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em sacarose 50% (m/v). Após nova centrifugação a 2500 x g por 1 minuto, os ovos foram coletados do sobrenadante em peneira de 400 mesh. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido (- 196 °C) e armazenadas a - 80 °C.

5.3. Extração de Juvenis J2

A produção de juvenis infectivos (J2pp) de nematoides parasitas de plantas se baseia no sistema de eclosão *in vitro*. Foram utilizadas pequenas vasilhas e peneiras, ambas de plástico (uso doméstico) e de mesmo diâmetro. Água destilada estéril foi adicionada as vasilhas, que apoiam as peneiras forradas com dupla camada de papel toalha, aonde os ovos coletados são depositados. Espontaneamente, os ovos se desenvolvem em juvenis J1, que continuam retidos na cutícula do ovo. Subsequentemente, esses juvenis J1 se desenvolvem em juvenis J2pp que eclodem, migrando do papel toalha para a vasilha e sedimentando no fundo do recipiente. Os J2pp foram então coletados por centrifugação a 2500 x g por 30 minutos em tubo Falcon de 50 mL. Após a retirada cuidadosa do sobrenadante, os foram ressuspensos em volume menor e transferidos para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (eppendorf) e novamente centrifugados a 7000 x g por 3 minutos. Toda água foi retirada e os J2pp imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a - 80 °C.

5.4. Extração de Fêmeas

A extração de fêmeas se inicia com a separação cuidadosa de solo do sistema radicular, utilizando água corrente. As raízes foram picotadas com tesoura e incubadas em solução de pectinase 25% (v/v) por 16 horas. Posteriormente, o tecido radicular amolecido libera as fêmeas, que foram lavadas, ficando retidas em peneira de 100 mesh. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 10 minutos em suspensão de caulim (substrato inerte). Após a ressuspensão do precipitado em sacarose

40% (m/v), segue-se nova centrifugação a 2500 x g por 1 minuto. As fêmeas, concentradas sobre a solução de sacarose, foram retidas em peneira de mesma malha, lavadas com água destilada e transferidas para béquer. Uma separação visual, com micropipeta de 1 mL (P1000), assegura maior integridade e pureza das fêmeas coletadas. Usam-se duas ponteiras azuis, uma cortada para pipetar as fêmeas, sem danificá-las, para um tubo de micro centrífuga e outra amassada na ponta para retirar a sujeira residual da coleta. A amostra foi então sedimentada por centrifugação a 2000 x g por 1 minuto para completa retirada de água e armazenada a – 80 °C. Em média, obteve-se 8 mg de fêmeas por grama de raiz.

5.5. Extração de RNA total

O RNA total de ovos, juvenis J2pp e fêmeas adultas de *M. incognita* foi extraído utilizando o kit RNASpin Mini RNA Isolation (G&E), seguindo as instruções do fornecedor. A purificação baseia-se na adsorção diferencial do RNA a uma membrana de sílica, sob alta concentração salina, enquanto DNA e proteínas são eliminados por múltiplas lavagens. Resumidamente, ovos, juvenis ou fêmeas foram lisados e homogeneizados em tampão desnaturante, com isotiocianato de guanidina, a fim de inibir a atividade ribonucleásica endógena e o lisado aplicado numa microcoluna contendo a membrana de sílica. A coluna foi lavada três vezes e o RNA eluído com água MilliQ e armazenado a – 80 °C.

5.6. Reação de Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa consiste na síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de um molde de RNA, por uma DNA-polimerase-RNA-dependente, a transcriptase reversa.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) a partir de RNA total de ovos, juvenis J2pp e fêmeas de *M. incognita*. Inicialmente, 5 µg de RNA total, 1 µM do oligodT (**Anexo I**) e 10 mM de dNTP's foram incubados a 65 °C por 5 minutos para quebrar estruturas secundárias e permitir o anelamento do oligonucleotídeo. Posteriormente, essa reação foi incubada no gelo por 2 minutos. Uma mistura de reação, contendo 50 U da enzima transcriptase reversa Superscript™ II RT, 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT e 1 U de RNase Out, foi incubada a 42 °C por 1 hora. A transcriptase reversa foi inativada a 70°C. Por fim, foram adicionadas 2 U de RNase H e a reação foi incubada a 37 °C durante 20 minutos e o cDNA armazenado a – 20 °C.

5.7. RT-PCR

O RT-PCR é uma reação da polimerase em cadeia que utiliza como molde o cDNA, ou seja a fita simples e antisenso, reversa e complementar, ao mRNA. Essa técnica oferece uma maneira prática de isolar genes que estão sendo expressos, ou pelo menos transcritos, na condição espacial e temporal na qual o RNA fora extraído. A fração gênica que codifica mRNAs é muito pequena em relação ao genoma completo e os genes de interesse geralmente

estão “diluídos”. Dessa forma, evita-se o isolamento de produtos inespecíficos como pseudogenes ou regiões não codificadoras presentes no genoma. Ao mesmo tempo, ao partir de cDNA, apenas a sequência codificadora é amplificada, sem os íntrons, que podem aumentar muito o tamanho do gene isolado de gDNA, dificultando a amplificação, clonagem e sequenciamento.

O fragmento gênico codificador da Isocitrato Liase foi amplificado por RT-PCR a partir de cDNAs de ovo, J2pp e fêmea, utilizando oligonucleotídeos específicos. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir de uma sequência de *Meloidogyne javanica* retirada do GenBank (gi|15003598|).

A PCR continha 2,5 U de DNA Taq polimerase, 2 mM MgCl₂, 200 μM de dNTPs e 400 nM de cada oligonucleotídeo. O programa da PCR foi: um passo de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de incubação a 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, seguido por uma etapa final de alongação a 72 °C por 4 minutos. Os produtos de PCR foram re-amplificados numa segunda rodada de PCR, com os mesmos parâmetros, utilizando 1 μL da primeira rodada como molde e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

5.8. Amplificação dos fragmentos gênicos da biblioteca de cDNA de Juvenis

O fragmento gênico de *hsp90* foi amplificado de uma biblioteca de cDNA de J2pp de *M. incognita* (FRAGOSO, 2006a) por meio da técnica de PCR. Os parâmetros utilizados foram os mesmos citados anteriormente, com

alteração apenas nas temperaturas de anelamento. Foi utilizado 1 µL de cinco amostras distintas como molde e temperatura de anelamento de 50 °C.

5.9. Clonagem e Extração de DNA plasmidial

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos com tamanho esperado foram excisados do gel, purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel extraction (QIAGEN) e quantificados por espectrofotometria. Os fragmentos purificados foram ligados em 50 ng do vetor pGEM-T easy (Promega), com 4 U de T4 DNA ligase em 15 µL de reação de ligação. Os plasmídeos ligados foram usados para transformar *Escherichia coli* XL-1 Blue por eletroporação (1,8 kV, 200 Ω e 25 µF). Os clones resistentes à ampicilina (100 µg/mL) foram selecionados por PCR de colônia e por α-complementação (1 mg de X-GAL e 2 mg de IPTG sobre o meio para cada placa de Ø 70 mm). As preparações de DNA plasmidial foram feitas em pequena escala por lise alcalina, seguindo-se metodologia padrão (SAMBROOK, *et al.*, 1989).

5.10. Sequenciamento e Análise das Sequências

Os fragmentos clonados (500 ng de vetor) foram sequenciados num sequenciador automático ABI 3100 para confirmação, utilizando-se 4 pmoles de oligonucleotídeos T7 ou SP6. As sequências obtidas foram submetidas contra o banco de dados do GenBank™ pelos programas BLASTn e BLASTp, no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Alguns parâmetros (T_m , %GC, loop, homodímero) foram gerados pelo programa Oligotech (<http://www.oligotech.com/analysis.php>) para auxiliar no desenho dos oligonucleotídeos.

5.11. Subclonagem em Vetor para RNAi

Cada fragmento gênico foi clonado primeiramente no plasmídeo de entrada pDONR221 do sistema Gateway[®] (Invitrogen) (**Figura 6**). A reação de recombinação foi realizada utilizando-se 300 ng do produto de PCR, contendo os sítios de recombinação *attB*, 300 ng do vetor pDONR221, com os sítios *attP*, e 100 U da recombinase BP Clonase[™] II (**Figura 7A**). A reação foi incubada a 25 °C durante 16 horas. Para inativação da recombinase, foi adicionado 1 µL de Proteinase K à reação, que foi incubada a 37 °C por 10 minutos. Para propagação dos vetores, foi realizado choque térmico de células competentes de *E. coli*, linhagem *One Shot* TOP10 (Invitrogen), seguindo os parâmetros: 30 minutos no gelo, 30 segundos a 42 °C e dois minutos no gelo. As células foram ressuspensas em 250 µL de meio LB (Luria-Bertani) e mantidas a 37 °C por uma hora. Logo em seguida, foram semeadas em placas com meio LB sólido contendo o antibiótico canamicina (100 µg/mL). A seleção de clones positivos do sistema Gateway[®] baseia-se em seleção negativa devido a presença do gene letal *ccdB*. A proteína CcdB interfere na atividade da DNA Girase de *E. coli*, inibindo o seu crescimento. Quando a recombinação ocorre, há a substituição do gene *ccdB* pelo gene de interesse, portanto apenas as células que possuem o fragmento gênico de interesse clonado no pDONR221 crescerão em meio seletivo com antibiótico canamicina. A partir dessa etapa, todos os plasmídeos recombinados devem ser mantidos na linhagem TOP 10,

que são susceptíveis aos efeitos do gene *ccdB*, permitindo a seleção apenas dos clones que possuem o vetor corretamente recombinado. As preparações de DNA plasmidial foram feitas em pequena escala por lise alcalina, seguindo-se metodologia padrão (SAMBROOK, *et al.*, 1989).

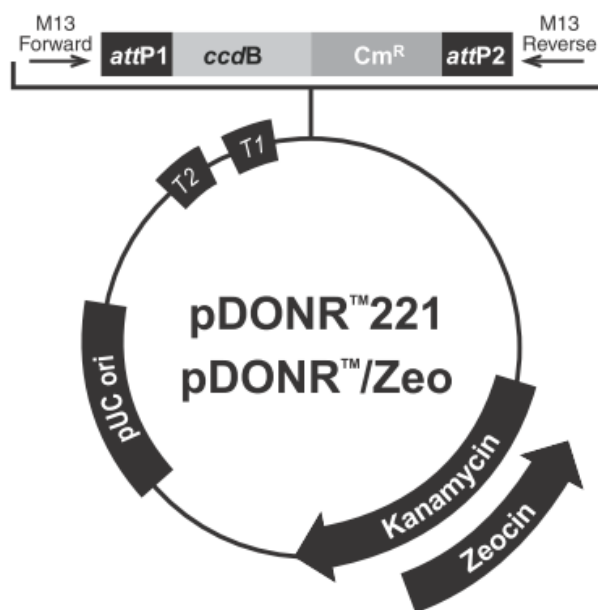


Figura 6. **Desenho esquemático do plasmídeo de entrada pDONR221.** Os sítios de recombinação *attP1* e *attP2* flanqueiam o gene letal *ccdB* e o gene de resistência ao antibiótico clorafenicol, que são substituídos pelo fragmento gênico após a reação de recombinação.

A presença dos fragmentos gênicos subclonados no plasmídeo pDONR221 foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos. Os vetores foram sequenciados com os oligos M13 senso e M13 antisense para confirmação definitiva. Finalmente, foi montado o sistema de recombinação com o vetor destino para RNAi pk7GWIWG2(I) (**Fig. 8**). A reação de recombinação foi realizada usando 300 ng do pDONR221 contendo o fragmento gênico de interesse flanqueado pelos sítios de recombinação *attL* (oriundo da recombinação do *attB*), 300 ng do vetor pk7GWIWG2(I), contendo

os sítios de recombinação *attR*, 15 U de Topoisomerase I para manter o vetor destino desenovelado e 100 U da recombinase LR clonaseTM II (**Fig. 7B**). A reação foi incubada a 25 °C durante 16 horas. Ao final, foi adicionado 1µL de Proteinase K e a reação incubada a 37 °C por 10 minutos para inativação da enzima. Os vetores obtidos foram usados para transformação por choque térmico de *E. coli* linhagem *One Shot* TOP10. A seleção de clones positivos baseia-se na mesma metodologia descrita anteriormente. Após a confirmação da subclonagem dos fragmentos gênicos por PCR com oligos específicos e digestão com endonucleases de restrição, os plasmídeos foram introduzidos por eletroporação na linhagem GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*.

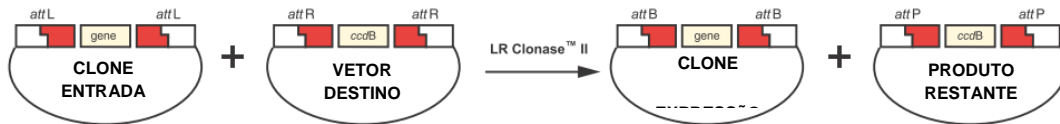
A**B**

Figura 7. Representação esquemática para clonagem de genes utilizando a metodologia Gateway®. **(A)** A primeira reação de recombinação, catalisada pela enzima BP clonase, utiliza o produto de PCR amplificado com os sítios de recombinação *attB* e o vetor doador contendo os sítios de recombinação *attP* para geração do vetor de entrada. **(B)** A segunda reação de recombinação, catalisada pela enzima LR clonase, utiliza o vetor de entrada contendo os sítios de recombinação *attL* e o vetor destino contendo os sítios de recombinação *attR* para geração do vetor final.

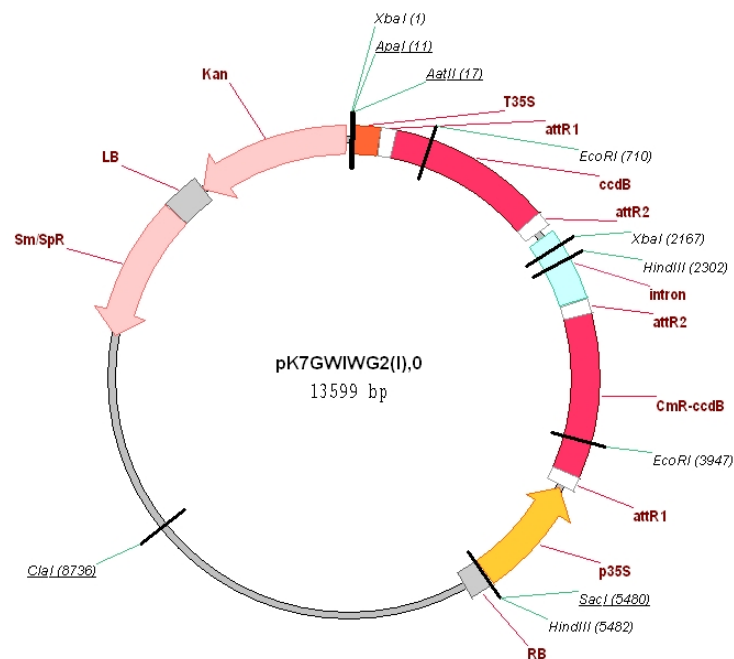


Figura 8. **Desenho esquemático do plasmídeo para RNAi pk7GWIWG2(I) para transformação de plantas.** Os genes CmR e ccdB são substituídos pelo fragmento gênico de interesse, nos sentidos senso e antisense, separado por um íntron e controlado pelo promotor 35SCaMV.

5.12. Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Utilizando uma alça de platina, a linhagem GV3101 foi semeada em meio YEB sólido acrescido de 100 µg/mL de rifampicina, 50 µg/mL de gentamicina e incubada a 28 °C por 16 horas. Uma colônia isolada foi então inoculada em 60 mL de meio YEB líquido contendo 100 µg/mL de rifampicina, 50 µg/mL de gentamicina e incubada a 28 °C, 150 rpm durante 16 horas, até atingir a fase exponencial (OD₆₀₀ 0,5 a 1,0). A suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, as células precipitadas foram ressuspensas delicadamente com HEPES/KOH 1 mM gelado, para uma primeira lavagem. Após a segunda

lavagem nas mesmas condições, as células foram ressuspensas suavemente em 10 mL de glicerol 10% estéril gelado e centrifugadas conforme descrito acima. Por fim, as células foram ressuspensas em 800 µL de glicerol 10% estéril gelado e foram separadas em alíquotas de 40 µL, que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer – 80 °C.

5.13. Transformação de *Nicotiana tabacum*

A linhagem GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os plasmídeos de interesse foi cultivada em meio de crescimento sólido LB contendo 100 µg/mL de rifampicina, 50 µg/mL de gentamicina e 300 µg/mL de estreptomicina durante 48 horas a 28 °C. Com a ajuda de uma alça de platina, uma colônia isolada foi transferida para 15 mL de meio LB líquido com as mesmas concentrações de antibióticos citadas acima. O inóculo foi incubado a 28 °C, 150 rpm durante 16 horas, até atingir a fase exponencial de crescimento (OD₆₀₀ de 0,5 a 1,0). Posteriormente, 1 mL da suspensão bacteriana foi transferido para um tubo de microcentrífuga estéril e submetido a centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em NaCl 0,85% estéril.

As folhas de plantas de tabaco micropropagadas *in vitro* foram retiradas e cortadas em quadrados de aproximadamente 1,0 cm². Os fragmentos foliares foram transferidos imediatamente para meio MS líquido (MURASHIGE ;SKOOG, 1962) e em seguida foi adicionado 200 µL da suspensão bacteriana ao meio, que foi agitado delicadamente. Os explantes foram incubados nesse

meio durante 20 minutos para possibilitar a infecção com agrobactéria, transferidos para MS sólido e incubados no escuro por um período de 48 horas. Posteriormente, os explantes foram transferidos para um novo meio MS sólido contendo 1 mg/L do hormônio 6-benzilaminopurina (BAP) para indução de brotos, 500 mg/L de cefotaxima para evitar o crescimento das agrobactérias remanescentes e 100 mg/L de canamicina para selecionar as células transformadas. Os explantes foram incubados em uma sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25 °C.

Após aproximadamente quatro semanas de incubação os fragmentos foliares foram cortados em quatro pedaços e os pequenos calos formados foram transferidos para um meio MS novo contendo 1 mg/L de BAP, 250 mg/L de cefotaxima e 100 mg/L de canamicina. Depois de 4 semanas de incubação nas mesmas condições, os brotos maiores que 0,7 cm foram transferidos individualmente para magentas contendo meio MS sólido acrescido de 250 mg/L de cefotaxima e 100 mg/L de canamicina. As plantas foram mantidas nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes, depois foram transferidas para copos de plástico contendo a mistura solo:vermiculita estéril e mantidas em casa de vegetação até a maturação e obtenção de sementes para obtenção de geração T1e T2 das linhagens transgênicas.

5.14. Análise da expressão gênica por PCR em tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão diferencial dos dois genes-alvo foi realizada utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), normalizado pela expressão dos genes constitutivos 18S rRNA, β -tubulina, GAPDH e Fator de alongação. Para análise do padrão de expressão gênica a qRT-PCR foi realizada comparando quatro estádios de desenvolvimento: ovo, J2pp, J2/J3/J4 e fêmea. Os experimentos de qRT-PCR foram conduzidos no termociclador 7500 da Applied Biosystems.

A partir de 1 μ g de RNA total extraído de ovo, J2pp, J2/J3/J4 e fêmea foi sintetizado o cDNA utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen), seguindo as indicações do fabricante. A PCR continha os seguintes reagentes: SYBR Green 1X (LGC), 200 nM de cada primer (senso e antisenso) e cDNA de ovo, J2pp, J2/J3/J4 e fêmea. O programa da PCR foi o seguinte: 95 °C por quinze minutos, 95 °C por trinta segundos, 60 °C por um minuto repetidos por 45 ciclos. Após a amplificação, foi determinada a curva de “melting” para verificar a presença de amplificação inespecífica ou formação de dímeros entre os oligonucleotídeos, cujo programa foi: 95 °C por quinze segundos, 60 °C por quinze segundos, subindo 2 °C por minuto, até chegar à 95 °C novamente.

Para a análise de expressão gênica é fundamental a determinação da eficiência de amplificação (PFAFFL, 2001), calculada pela seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$. Sendo que, o coeficiente angular, corresponde a inclinação da reta obtida por regressão linear dos valores de Ct em função do

log das diluições de cDNA (curva padrão). Os dados gerados foram analisados pelo programa “qBase Plus”. Este programa recebe os dados brutos de Ct para cálculo de expressão relativa normalizada com os genes constitutivos.

5.15. Seleção das plantas transformadas com as construções para silenciamento gênico

As sementes geradas na geração T0 foram coletadas após o período de maturação e armazenadas até o uso. Para seleção das plantas transformadas, as sementes tiveram suas superfícies desinfetadas por incubação em álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos seguido de 4 lavagens com água estéril. Em seguida, foram posicionadas em placas de meio MS sólido contendo 300 mg/L de canamicina para seleção.

As sementes que germinaram e enraizaram foram genotipadas individualmente utilizando o Extract-N-Amp Plant PCR kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), para detectar a presença do fragmento transgênico correspondente no genoma de cada evento gerado no sentido senso e anti-senso com oligonucleotídeos que se anelam tanto no fragmento gênico como no íntron do vetor. Após a confirmação da presença do transgene por PCR as plântulas foram transferidas para copos plásticos de 300 mL para aclimação em casa de vegetação. Depois da aclimação as plantas foram genotipadas novamente, individualmente, por PCR utilizando o Extract-N-Amp Plant PCR kit. As plantas genotipadas como positivas foram conduzidas até a geração T2 e posteriormente utilizadas em bioensaios de infecção por *M. incognita*.

5.16. Bioensaios de infecção de *M. incognita* em eventos de *N. tabacum* expressando dsRNA

Após 15 dias de aclimação, oito a dez plantas de cada evento de transformação foram utilizadas em cada repetição biológica para os bioensaios de inoculação de J2 pré-parasíticos de *M. incognita*. Aproximadamente 1.000 J2pp foram inoculados por planta e o bioensaio foi mantido em câmara climatizada com controle de umidade e temperatura. Seis semanas após a inoculação as raízes de cada planta foram processadas individualmente para a extração de ovos de acordo com Hussey e Barker (HUSSEY, 1973). O parâmetro nematológico avaliado neste bioensaio foi o número de ovos por grama de raiz, que indica o nível de resistência da planta ao nematoide. Os dados foram validados estatisticamente pelo Teste de Tukey.

5.17. RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes-alvo em *M. incognita* que infectaram eventos de *N. tabacum* expressando dsRNA.

Plantas de tabaco que expressaram o grampo do dsRNA de cada evento foram transplantadas do meio MS para o solo em copos plásticos de 300 mL, e aclimatadas em casa de vegetação. Foram utilizadas de 5 a 7 plantas para cada evento e aproximadamente 1.000 J2 pré-parasíticos foram inoculados por planta. Seis semanas após a inoculação as raízes foram processadas e os ovos extraídos de acordo com Hussey e Barker (HUSSEY ;BARKER, 1973).

Para cada evento, os ovos de *M. incognita* foram triturados em “pool” com nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo, e o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Mini kit (Qiagen, EUA). O RNA foi tratado com

DNase I Turbo (Ambion, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o “SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, EUA) utilizando 500 ng de RNA total.

Para realização e análise da qRT-PCR foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.

5.18. Análise morfológica das células gigantes nas plantas expressando dsRNA dos genes-alvo por microscopia

As sementes de tabaco das cinco linhagens RNAi de *hsp90* (1, 2, 4, 5 e 6), Isocitrato Liase (1, 2, 3, 5 e 6) e uma linhagem não-transgênica foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio e etanol por 10 minutos e em seguida lavadas 3 vezes com etanol absoluto. Posteriormente, as sementes foram germinadas a 20 °C em meio MS sólido acrescido de 300 mg/L de canamicina para seleção.

Depois de aproximadamente 25 dias 8 plantas de cada linhagem foram transferidas do meio MS para potes individuais de solo autoclavado e mantidas em câmara de crescimento (fotoperíodo 16 horas dia/8 horas noite, temperatura 25 °C). Após 20 dias de transplantadas, cada planta foi inoculada com 1.000 J2 e mantidas nas mesmas condições de crescimento.

As coletas de raízes para retirada de galhas para análise morfológica foram feitas em 14 e 28 dias após o inóculo com os nematoides. Em cada tempo após inoculação foi coletada uma raiz de cada linhagem e as galhas

foram retiradas e colocadas imediatamente em glutaraldeído 2,0% e submetidas a 20 minutos de vácuo para facilitar a penetração do fixativo no tecido. A fixação das galhas foi feita durante 15 dias na temperatura de 4 °C sob agitação constante, o fixativo foi trocado a cada dois dias.

As galhas já fixadas foram então submetidas ao processo de desidratação nas seguintes condições: 1 hora em tampão Pipes pH 6,9; 2 horas em etanol 15%; 2 horas em etanol 30%; 2 horas em etanol 50%, 16 horas em etanol 70%. No dia seguinte seguiu-se com a desidratação: 2 horas em etanol 85% e pelo menos 6 horas em etanol 100%, trocando o etanol a cada 2 horas. Esse processo todo foi realizado no gelo, para que a ação do álcool no tecido fosse lenta.

Depois de desidratadas, as galhas foram colocadas em solução de 50% Technovit 50% etanol e mantidas a 4 °C durante pelo menos 12 horas. Posteriormente, as galhas foram transferidas para 100% Technovit líquido e mantidas nessa solução por sete dias a 4 °C. Após esse processo, as galhas foram então embebidas em Techovit sólido (0,1 g de Hardner I em 10mL de Technovit, para cada 5 mL dessa solução adiciona-se 333 µL de Hardner II para polimerização).

Os blocos polimerizados de Technovit foram cortados em micrótomo na espessura de 3 µm e os cortes distribuídos em lâminas de polilisina. As lâminas foram mantidas a 45 °C por 16 h para que os cortes ficassem perfeitamente aderidos à lâmina. Depois de secas as lâminas foram coradas com azul de toluidina e observadas em microscópio óptico para análise morfológica das galhas.

5.19. Hibridização *in situ* whole mount

As sondas de RNA foram sintetizadas utilizando o kit DIG RNA labeling (SP6/T7) da Roche, seguindo as instruções do fabricante. Os J2 foram coletados de acordo com o protocolo descrito no item 3.3 e em seguida submetidos a hibridização. Primeiramente os nematoides foram fixados em 1 mL de tampão contendo 10% de formalina em PBS1X e incubados a temperatura ambiente durante 24 horas. Após o processo fixativo os nematoides foram colocados sobre uma placa de vidro e submetidos aos cortes utilizando uma lâmina de barbear acoplada a uma bomba de aquário. Os nematoides cortados foram em seguida colocados em um tubo de 1,5mL e lavados 3 vezes com 1 mL de PBS 1X. Para a permeabilização da cutícula os nematoides foram tratados com 1 mL de proteinase K 1 mg/mL e incubados durante uma hora a temperatura de 37°C. Seguiu-se novamente com 3 lavagens em PBS1X e o precipitado de nematoides foi incubado no congelador - 80 °C por 15 minutos. Em seguida o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de metanol gelado e mantido a temperatura ambiente por 2 minutos. Os nematoides foram centrifugados 10.000 rpm durante 1 minuto, retira-se o metanol e adiciona-se 1 mL de acetona gelada e segue-se uma incubação no freezer -80°C por 15 minutos. Novamente os nematoides são centrifugados por 10.000 rpm durante 1 minuto, a acetona é retirada e adiciona-se 500 µL de tampão de hibridização. Os nematoides são incubados no tampão de hibridização a 50 °C por 30 minutos e a sonda é adicionada e segue-se uma nova incubação a 42 °C por 16 h. Após o período de incubação

são realizadas duas lavagens de 10 minutos com SDS 0,1% e SSC 4X e mais duas lavagens com SDS 0,1% e SSC 0,1X.

6. RESULTADOS

6.1. Seleção dos genes-alvo

A seleção dos genes-alvo é uma etapa fundamental para o bom desenvolvimento e sucesso do trabalho. O grande diferencial nesse estudo, comparado ao que vem sendo realizado para o fitonematoide *M. incognita*, é o fato de os dois candidatos selecionados serem classificados como genes envolvidos em resposta a estresse e descritos como essenciais em várias espécies de nematoides. A maioria dos trabalhos já publicados envolvendo RNAi, tanto *in planta* quanto *in vitro* para esse fitonematoide, foram realizados silenciando genes de parasitismo ou efetores. Essa estratégia apresenta certa dificuldade visto que muitos desses genes de parasitismo pertencem a famílias gênicas. Dessa forma, existe grande possibilidade de o nematoide conseguir substituir o gene silenciado expressando outro de função similar e dar prosseguimento ao seu ciclo de vida e estabelecimento do parasitismo.

Nesse trabalho, dois genes-alvo foram selecionados para testes preliminares visando o controle de *M. incognita* por meio de RNAi. Primeiramente foi gerada uma biblioteca de EST de J2pp desse fitonematoide com 2880 sequencias (FRAGOSO, 2006a). Após a limpeza para retirada de sequencias plasmidiais, rRNA e sequencias de baixa qualidade foram montados 197 contigs e 1506 sequencias não foram agrupadas e categorizadas como singlets. A maioria dos contigs (138) foram formados por

apenas duas sequências, o que pode indicar a baixa expressão desses genes na fase J2pp. Por outro lado, os contigs que apresentaram de 11 a 45 sequências podem comparativamente indicar uma taxa de expressão alta. O gene codificador da Proteína de Choque Térmico 90 (*hsp90*) foi escolhido para silenciamento gênico devido à sua abundância nessa biblioteca de cDNA de juvenil 2 de *M. incognita* (FRAGOSO, 2006b). Nessa biblioteca foram encontrados 5 “reads” de *hsp90* com e-value baixo (e-109). Essas duas características mais o fato desse gene já ter apresentado grande potencial de intervenção no desenvolvimento de outras espécies de nematoides (MATTHEWS, *et al.*, 2003; DEVANEY, *et al.*, 2005a; BERDICHEVSKY, *et al.*, 2006) nos levaram a investigar o efeito do silenciamento desse gene na reprodução do fitonematoide *M. incognita*. O gene codificador de Isocitrato liase (ICL) foi selecionado por estar envolvido no metabolismo energético (ciclo do glioxilato) de juvenil 2 pré-parasita e, por isso, representa um bom candidato para controle de fitonematoides, uma vez que quando silenciado pode impedir o desenvolvimento do nematoide (BIRD, 2003). Uma EST codificadora de ICL já havia sido identificada em J2 de *M. incognita* (MCCARTER, *et al.*, 2003), além de um cDNA completo de ICL isolado de *M. javanica* (gi|15003598|).

É importante salientar que no início desse trabalho o genoma de *M. incognita* ainda não estava disponível. Entretanto, posteriormente foi realizada uma análise para verificar o número de *contigs* encontrados para cada gene-alvo. Para o gene *hsp90* foram encontrados 4 sequências nucleotídicas representadas por 4 *contigs*: Minc1640, Minc1642, Minc3038 e Minc18114 que por sua vez codificam 7 sequências peptídicas. Ao realizar o alinhamento nucleotídico para verificar com quantos *contigs* a sequência escolhida para uso

no silenciamento tem homologia foi observado que ocorre o alinhamento com apenas uma sequência do genoma. Para o gene Isocitrato liase foram encontrados 2 *contigs*: Minc9712 e Minc13172 que codificam duas sequências peptídicas. O alinhamento nucleotídico da sequência escolhida para uso no silenciamento foi observado para ambas as sequências encontradas no genoma, evidenciando a grande probabilidade do silenciamento gênico ser muito eficiente.

6.2. Escolha de regiões específicas para *M. incognita* de cada gene para silenciamento via RNAi

Após a seleção dos genes-alvo, procedeu-se a escolha das melhores regiões para interferência mediada por RNA dupla fita, que foi auxiliada pelos programas Block-IT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com>) e BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov). Detalhadamente, para cada gene, suas ESTs codificadoras foram alinhadas a fim de determinar a sequência consenso, pelo menos quando havia sobreposição entre as ESTs. Como não havia EST codificadora de Isocitrato liase na referida biblioteca, foi utilizada para esta análise a sequência do gene de *M. javanica* (gi|15003598|). Após submeter às sequências consenso conservadas ao programa Block-IT™, foi possível determinar as regiões com maior probabilidade para produção de siRNAs eficientes. Então, cada uma das regiões escolhidas foi submetida ao BLASTn a fim de identificar possíveis efeitos cruzados de RNAi em plantas, humanos e outros organismos não-alvo, mensurado como percentual de identidade de sequência nucleotídica (**Tabela 5**). A intersecção das probabilidades de maior

eficiência de RNAi com menor efeito cruzado resultou nas regiões escolhidas para isolamento e clonagem em vetor para expressão de dsRNA *in planta*.

Tabela 5. Análise comparativa dos genes-alvo com o GenBank™.

Gene-alvo	BLASTn*	Espécie	E-value	Identidade	Nº de acesso
Isocitrato Liase	NSSE	–	–	–	–
HSP90	HSP90	<i>M. incognita</i>	0,0	98%	GU441459.1
		<i>M. javanica</i>	0,0	97%	AF201338
		<i>M. arenaria</i>	0,0	97%	EU364880
		<i>M. floridensis</i>	0,0	97%	EU364884
			0,0	97%	EU364885
			0,0	97%	EU364886
			0,0	97%	EU364887
			0,0	96%	EU364888
		<i>M. hapla</i>	1e ⁻¹³⁵	87%	AY528416
			1e ⁻¹³⁴	92%	AY528417

*Análise realizada em 20/02/2014 no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov.

NSSE = nenhuma similaridade significativa encontrada

Foi planejado utilizar apenas uma região para cada gene-alvo, resultando em dois fragmentos gênicos para amplificação. As regiões específicas para os genes Isocitrato liase (300 pb) e *hsp90* (700 pb) não possuem similaridade com nenhuma sequência do banco *nr* nem com nenhuma sequência de outro gene do genoma de *M. incognita*. Isto nos mostra a alta especificidade dessas sequências e pouca probabilidade da ocorrência de efeitos cruzados (“off-target”). Dessa forma, a possibilidade do dsRNA ser

produzido e influenciar a expressão de qualquer outro gene é reduzida. Então, a partir das sequências nucleotídicas das regiões escolhidas, os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificação por PCR dos fragmentos gênicos e adição das extremidades de reconhecimento *attB* para subclonagem por recombinação (Gateway[®] Technology).

6.3. Quantificação do acúmulo dos transcritos em diferentes estágios de vida de *M. incognita*

Para determinação do padrão de expressão gênica nos diferentes estágios de vida de *M. incognita* foi realizada uma análise *in silico* do banco de EST (dbEST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) e a quantificação dos transcritos por PCR em tempo real (qRT-PCR). Essa etapa é fundamental, pois é possível estabelecer a fase na qual a expressão de cada gene é maior ou menor e os resultados obtidos podem ser utilizados para análise após o silenciamento. O banco de EST (dbEST) possui 63.838 EST's de *M. incognita* (Dezembro de 2013), sendo 14.671 de ovos, 35.358 de juvenil 2 pré-parasita, 2.734 de J2/J3/J4 e 4.427 de fêmea adulta. A busca por *hsp90* e ICL foi feita contra sequencias não redundantes (NRdb-NCBI) para o filo Nematoda utilizando BlastX e cutoff < e-10. O gene gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como referência. A fase de ovo apresentou 30 EST's para *hsp90* e 2 para ICL. Na fase de J2 pré-parasita foram observadas 31 EST's de *hsp90* e 18 de J2 de ICL (**Figura 9**). Não foram observadas sequências para as fases parasíticas, provavelmente porque o total de EST's ainda é baixo e pouco representativo nesses estágios. Ao realizarmos a análise

de acúmulo de transcritos dos dois genes-alvo por qRT-PCR foi verificado que existem diferenças de acúmulo nos 4 estágios principais: ovo, J2 pré -parasita, J2/J3/J4 e fêmea.

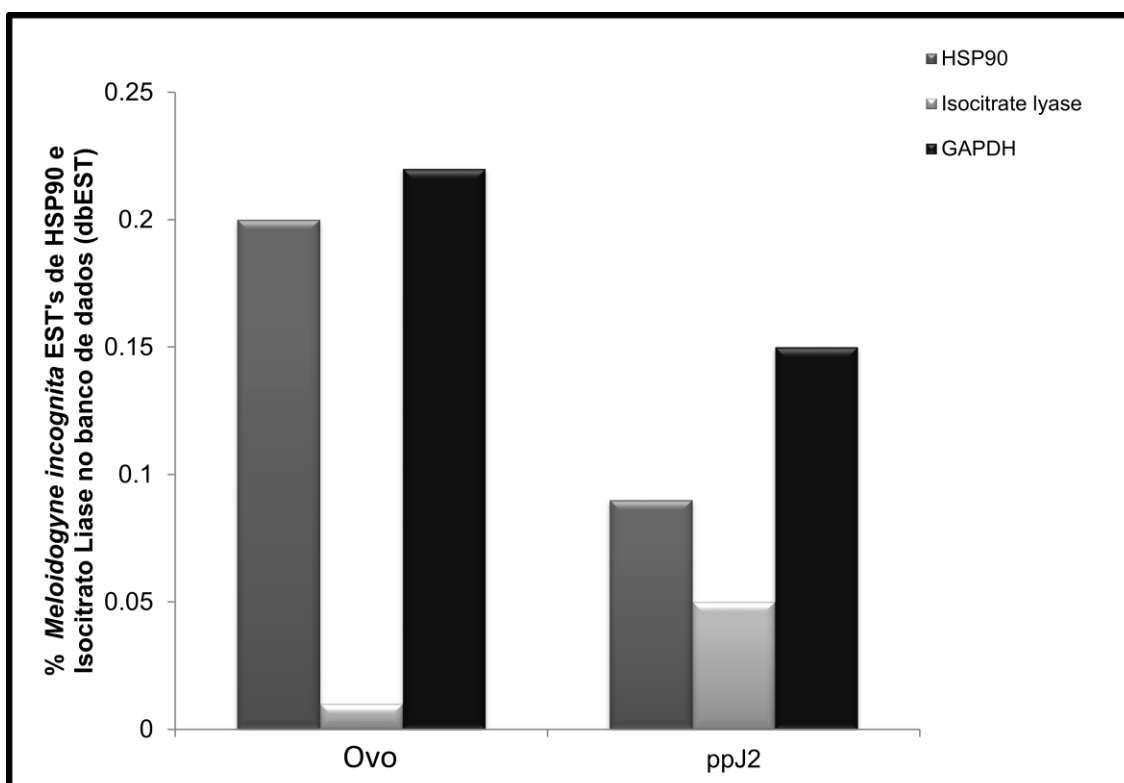


Figura 9: **Análise *in silico* de EST's de *Meloidogyne incognita* encontrados no banco de dados.** Percentual de EST's de *hsp90* e ICL encontrados no banco de dados dbEST mostrado por barras. EST's de ovos totalizam 14.671 seqüências, das quais 30 foram anotadas como *hsp90*, 2 como ICL e 32 como GAPDH. EST's de J2 pré parasitas totalizam 35.358 seqüências sendo 31 de *hsp90*, 18 de ICL e 52 de GAPDH.↓

O RNA total foi extraído dos quatro estágios investigados: ovo, J2 pré-parasítico, J2/J3/J4 e fêmea. Amostras de RNA total foram utilizados para síntese de cDNA de cada fase, que posteriormente foram utilizados para a análise por qRT-PCR. Em todos os casos as quantidades de acúmulo de transcrito foram relativizadas com a quantidade evidenciada em ovos por ser o

estádio inicial do ciclo do nematoide. As curvas de dissociação mostraram que não houve formação de dímeros dos oligonucleotídeos nem múltiplas amplificações em uma mesma reação. Os genes de referência utilizados para normalização foram 18S rRNA, β -tubulina, GAPDH e Fator de alongação.

A quantidade detectada de transcrito do gene Isocitrato Liase foi 5 vezes maior em fêmea do que em ovo. Já em J2 pré-parasítico o acúmulo de transcritos de Isocitrato Liase foi 58 vezes maior do que em ovo. Quando se comparou fêmea com J2 pré-parasítico o resultado foi aproximadamente 12 vezes maior em J2pp. Não foram detectados níveis de expressão relevantes na fase J2/J3/J4. Portanto, a ordem de acúmulo de transcrito de Isocitrato Liase nos diferentes estádios foi: J2pp > fêmea > ovo > J2/J3/J4 (**Figura 10**). Esses resultados nos mostram que existem diferenças no acúmulo de transcritos nos estádios de desenvolvimento. O maior acúmulo de transcritos em J2pp evidencia que esse gene é fundamental para a sobrevivência do nematoide fora da planta hospedeira, justamente na fase em que é necessária a utilização de lipídeos para produção de ATP e, conseqüentemente, manutenção do metabolismo. Adicionalmente, isso é indício de que essa proteína pode estar envolvida no processo inicial de infecção. A baixa expressão desse gene nos estádios J2/J3/J4 sugere que essa enzima provavelmente não está envolvida no estabelecimento do sítio de alimentação e parasitismo. No entanto, o gene volta a ter um leve aumento na expressão no estágio de fêmea, mostrando que provavelmente essa enzima pode estar envolvida de alguma forma no processo de reprodutivo, como por exemplo, na formação dos ovos dentro da fêmea.

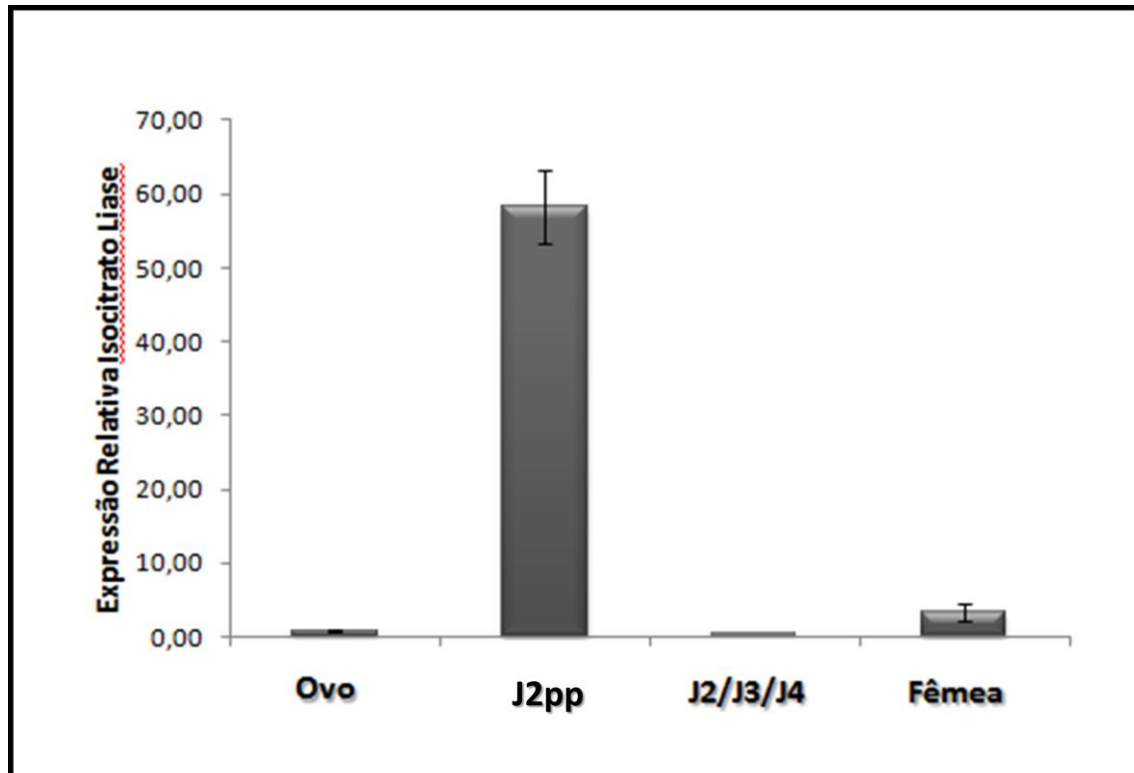


Figura 10: **Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos do gene Isocitrato Liase em *Meloidogyne incognita* nos 4 estágios de vida.** Para cada gene a amplificação foi feita em triplicata, utilizando cDNA de ovo, J2pp, J2/J3/J4 e fêmea. A análise foi realizada pelo programa qBASE e normalizada com os genes 18S rRNA, β -tubulina, GAPDH e Fator de Elongação.

Quando o gene codificador da proteína de choque térmico 90 (*hsp90*) foi avaliado, verificou-se que o acúmulo de transcritos em ovo, J2/J3/J4 e fêmea foi praticamente igual. Ao avaliarmos a quantidade em J2pp, esta foi 3 vezes menor do que nas outras fases. (**Figura 11**). Esse resultado nos mostra que o padrão de acúmulo de transcritos de *hsp90* pode ser considerado semelhante nos diferentes estádios de desenvolvimento. O resultado corrobora com dados já apresentados na literatura para o nematóide *C. elegans*, onde o gene *hsp90* é expresso constitutivamente em vários tecidos (GAISER, *et al.*, 2011). Por ser uma chaperona molecular, a proteína de choque térmico 90 está envolvida em

uma gama de processos e, portanto, é esperado que a expressão do gene codificador da mesma se dê em todas as fases da vida do nematoide.

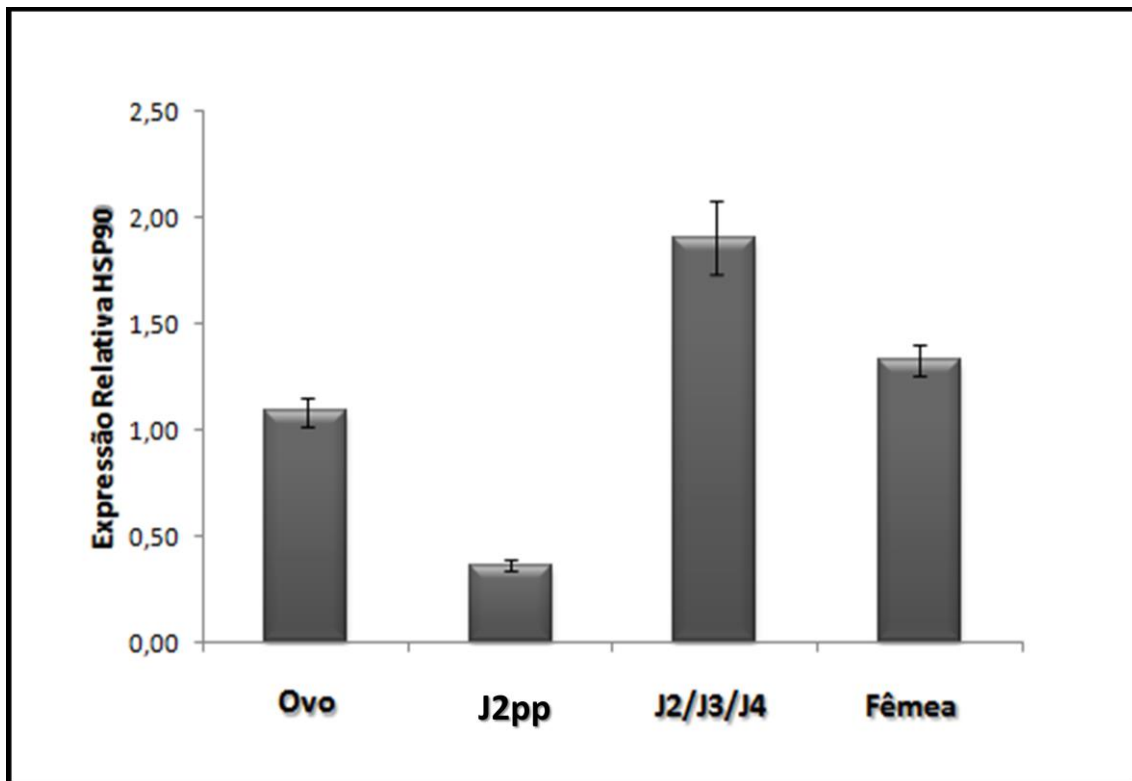


Figura 11: **Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos do gene *hsp90* em *M. incognita* nos 4 estágios de vida.** Para cada gene a amplificação foi feita em triplicata, utilizando cDNA de ovo, J2pp, J2/J3/J4 e fêmea. A análise foi realizada pelo programa qBASE e normalizada com os genes 18S rRNA, β -tubulina, GAPDH e Fator de Elongação.

6.4. Localização por Hibridização *in situ*

Para determinar a localização e expressão espacial dos genes-alvo foi realizada a hibridização *in situ* whole-mount nos J2 pré-parasitas. As sondas senso e antisenso de RNA dos genes-alvo foram marcadas com digoxigenina e, posteriormente, foi feita a ligação do anticorpo Anti-DIG que foi revelado com fosfatase alcalina.

A hibridização *in situ* nos J2 pré-parasitas mostrou um sinal forte dos transcritos de *hsp90* nas células musculares e na hipoderme (**Figura 12A e 12B**). Esse resultado corrobora com o padrão observado no nematoide modelo *C. elegans*, onde foram observados padrões de expressão similares aos encontrados no presente trabalho (GAISER, *et al.*, 2011).

A hibridização *in situ* do gene Isocitrato Liase apresentou sinal forte em grânulos localizados ao longo de todo sistema digestivo e na extremidade da cauda, região onde há maior acúmulo de lipídeos (**Figura 12D e 12E**). O resultado obtido também corrobora com o padrão observado em *C. elegans* (LIU, *et al.*, 1997). Os controles negativos com as sondas senso de ambos os genes não mostraram sinal, como esperado (**Figura 12C e 12F**).



Figura 12: **Localização dos transcritos por hidridização *in situ* whole mount dos genes *hsp90* e Isocitrato liase em juvenis 2 pré-parasitas de *M. incognita*.** O gene *hsp90* está localizado na hipoderme e células musculares (12A e 12B). O gene Isocitrato liase está localizado em forma de grânulos no sistema digestivo (12D e 12E). Os controles negativos com as sondas senso de ambos os genes não mostraram sinal, como esperado (12C e 12F).

6.5. Subclonagem das regiões selecionadas dos genes-alvo em vetor binário para silenciamento gênico *in planta*

A partir de fitonematoides multiplicados em plantas de tomateiro, procedeu-se a coleta de indivíduos em diferentes fases de desenvolvimento (ovo, J2pp e fêmea). Essas amostras de *M. incognita* foram submetidas à extração de RNA total e síntese de cDNA em pequena escala. Inicialmente, a qualidade do cDNA foi testada em RT-PCR com oligonucleotídeos para β -actina. Posteriormente, foram iniciadas as amplificações para isolamento do

fragmento gênico de Isocitrato liase. Foram utilizados como molde cDNA de ovo, J2pp e fêmea para a primeira PCR, com temperatura de anelamento de 45 °C. Em seguida, foi realizada uma segunda amplificação que utilizou como molde 1 µL da primeira reação de PCR e temperatura de anelamento de 50 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (**Figura 13**).

O fragmento gênico de *hsp90* foi amplificado usando como molde o DNA plasmidial da biblioteca de J2pp (pSPORT Invitrogen), contendo os cDNAs previamente isolados e sequenciados (FRAGOSO, 2006b). Para amplificação de *hsp90* foram utilizados cinco moldes distintos de DNA plasmidial e temperatura de anelamento de 50 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (**Figura 13**).

Os dois fragmentos gênicos foram subclonados por recombinação no vetor pDONR221 Gateway (Invitrogen) a partir do produto de PCR e sequenciados em triplicata utilizando os oligos universais M13 para confirmar se o produto amplificado realmente era o fragmento gênico de interesse.

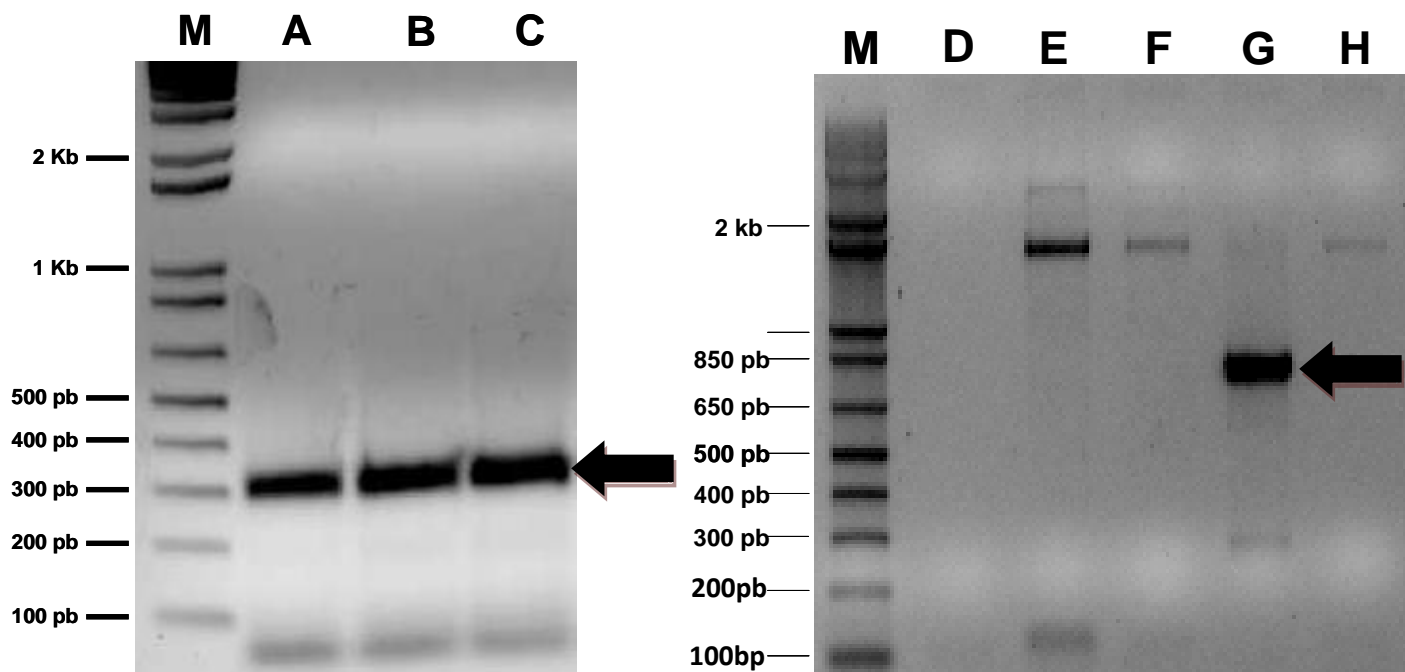


Figura 13. **Amplificação dos fragmentos gênicos de Isocitrato Liase e *hsp90***. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando como molde os cDNAs de *Meloidogyne incognita* nas fases de ovo (A), juvenil 2 (B) e fêmea adulta (C) e DNA dos clones de uma biblioteca de cDNA de juvenil 2 de *Meloidogyne incognita*. (D, E, F e H) clones que não amplificaram o fragmento de interesse; (H) amplificação do produto de PCR de 782 pb, correspondente ao fragmento de gênico de *hsp90*. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o marcador de massa 1 kb ladder plus da Invitrogen™ (M).

Após confirmação das subclonagens no vetor de entrada, partiu-se para recombinação no vetor binário final pK7GWIWG2 (I). As duas construções foram inseridas e mantidas na linhagem OminiMax 2T1 R de *E. coli*. Para verificar a subclonagem das duas cópias, senso e antisenso, dos dois fragmentos gênicos no vetor pK7GWIWG2(I) e a orientação do íntron (5' → 3'), foi feita análise por digestão com endonucleases de restrição. O vetor pk7IL

(Figura 14) foi digerido com as enzimas *Hind*III e *Xba*I e o vetor *pk7hsp90* (Figura 15) foi digerido com *Sac*I e *Xba*I. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Para confirmação da subclonagem das duas cópias e da presença do íntron na posição 5' → 3' eram esperados dois fragmentos para cada gene: Isocitrato Liase 1.783 pb e 777 pb e *hsp 90* 2.375 pb e 1.236 pb que foram observados em ambos os casos.

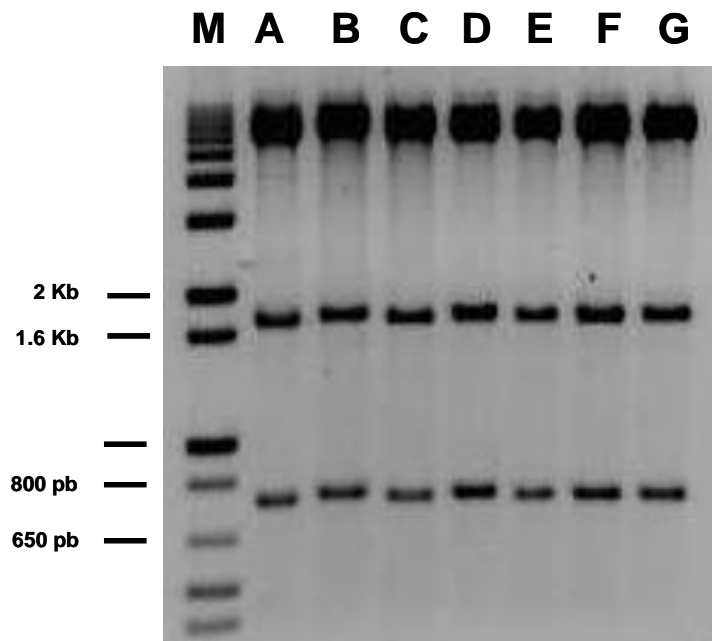


Figura 14. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7IL com *Hind*III e *Xba*I. Eletroforese em gel de agarose 1% dos clones contendo o vetor pK7IL (A a G). Todos apresentaram as duas bandas de tamanho esperado, 1.783 pb e 777 pb, confirmando a presença das cópias senso e antisense do fragmento gênico de Isocitrato Liase e a orientação 5' → 3' do íntron. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™.

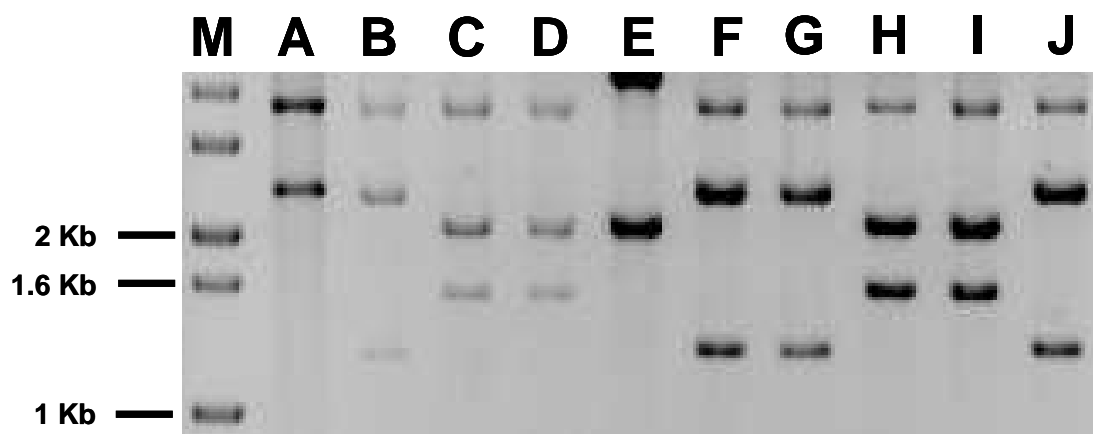


Figura 15. **Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7*hsp90* com *SacI* e *XbaI*.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos clones contendo o vetor pK7*hsp90* (A a J). Os clones C, D, H e I apresentaram fragmentos do tamanho diferente do esperado, indicando a presença do íntron na posição invertida (3' → 5'). Os clones B, F, G e J apresentaram os dois fragmentos de tamanho esperado, 2.375 pb e 1.236 pb, confirmando a presença das cópias senso e antisenso do fragmento gênico de *hsp90* e a orientação 5' → 3' do íntron. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™.

6.6. Transformação de *N. tabacum* e seleção dos eventos transformados na geração T1 das construções pK7GWIWG2(I) – *hsp90* e pK7GWIWG2(I) – Isocitrato Liase

As construções finais pK7GWIWG2(I) – Isocitrato Liase e pK7GWIWG2(I) – *hsp90* foram inseridas na linhagem GV3101 de *A. tumefaciens* por eletroporação. Após a confirmação da inserção do plasmídeo na bactéria por PCR, as colônias positivas foram mantidas congeladas em estoque glicerol no freezer -80 °C e, posteriormente, inoculadas em meio YEB para crescimento e em seguida utilizadas para transformação de fumo.

Para cada fragmento gênico foi realizada co-cultura de 100 fragmentos foliares de plantas de fumo com *A. tumefaciens*. Adicionalmente, foram feitos três controles experimentais distintos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Composição dos meios para transformação e regeneração de explantes de *Nicotiana tabacum*.

Controle	Composição	Tratamento	Finalidade
1	BAP	Sem Co-cultivo com agrobactéria	Avaliar a eficiência do hormônio BAP
2	BAP + Cefotaxima	Co-cultivo com agrobactéria	Avaliar a eficiência do antibiótico cefotaxima
3	BAP + Cefotaxima + Canamicina	Sem co-cultivo com agrobactéria	Avaliar a eficiência do antibiótico canamicina

No controle 1 foi observado que os fragmentos foliares se regeneraram rapidamente, dando origem a inúmeros brotos (**Figura 16A**), confirmando a eficiência do hormônio de indução de brotos BAP. No controle 2 observou-se que não houve crescimento de nenhuma agrobactéria remanescente, comprovando a eficiência do antibiótico cefotaxima (**Figura 16B**). No controle 3 os fragmentos foliares que não foram co-cultivados com agrobactéria não se regeneraram e morreram, o que confirma a eficiência do antibiótico canamicina na eliminação de células não transformadas (**Figura 16C**). O processo de

transformação completo levou cerca de 8 meses para obtenção da linhagem T0 de plantas transgênicas. Para cada construção foram obtidas cerca de 6 plantas, resultando em uma eficiência de transformação de 6%. As plantas transformadas foram então mantidas em casa de vegetação até sua completa maturação e obtenção de sementes. As plantas genotipadas como positivas por PCR foram conduzidas até a geração T2 e, posteriormente, utilizadas em bioensaios de infecção por *M. incognita*.

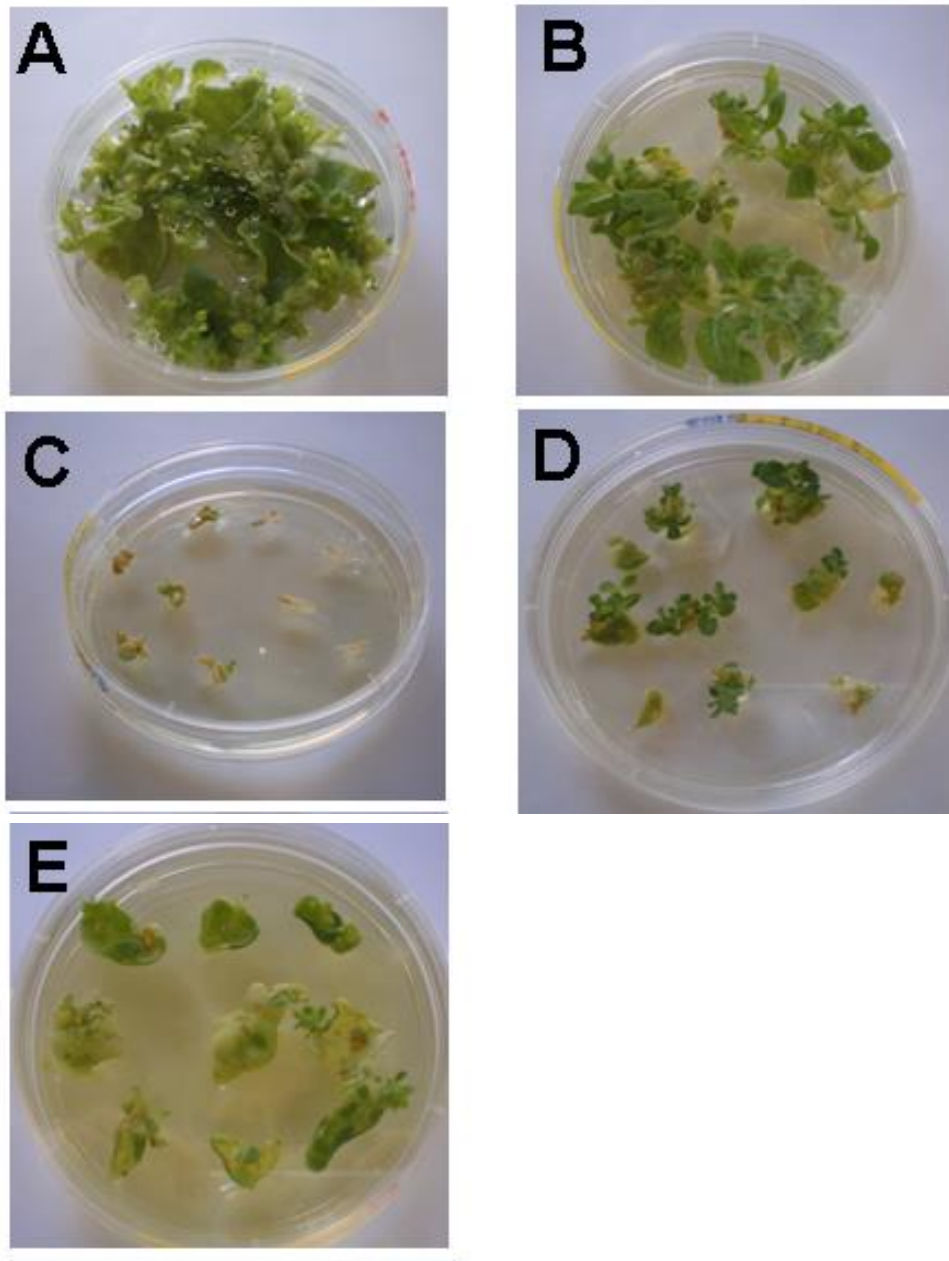


Figura 16. **Explantos de *Nicotiana tabacum* em placas para cultura de tecidos.** (A) Fragmentos foliares não transformados para testar a eficiência do hormônio de indução de brotos BAP (6-benzilaminopurina). (B) Fragmentos foliares transformados via agrobactéria para avaliar a eficiência do antibiótico cefotaxima. (C) Fragmentos foliares não transformados para avaliar a eficiência da seleção pelo antibiótico canamicina. (D e E) Fragmentos foliares transformados com os genes Isocitrato Liase e HSP 90 respectivamente, apresentando formação de brotos.

6.7. Bioensaios dos eventos transformados com as construções pK7GWIWG2(I) – hsp90 e pK7GWIWG2(I) – Isocitrato Liase contra *M. incognita*

O sucesso do parasitismo dos fitonematoides e conseqüentemente o sucesso reprodutivo depende significativamente da interação que o nematoide estabelece com a planta hospedeira. Dessa forma, quando realizamos o silenciamento gênico temos justamente o intuito de influenciar essa interação planta-nematoide e, por conseguinte, dificultar a formação do sítio de alimentação ou diminuir as taxas reprodutivas. Considerando que os dois genes-alvo possuem função essencial para a sobrevivência do nematoide, esse estudo foi realizado para investigar a possibilidade de o silenciamento gênico levar a uma redução na taxa de reprodução dos nematoides no hospedeiro. Para verificar o efeito do silenciamento dos genes-alvo nos nematoides foram realizados bioensaios infectando J2 pré-parasíticos nas plantas transformadas com as construções e nas plantas não transformadas, que foram utilizadas como controle.

Primeiramente, as sementes das linhagens transgênicas foram colocadas para germinar em meio Murashige e Skoong (MS) seletivo contendo o antibiótico canamicina na concentração final 300 µg/mL. Esse meio de seleção é altamente estrigente e somente as plantas transgênicas tem capacidade de apresentar desenvolvimento completo (**Figura 17**). Após aproximadamente 20 dias, as plantas que se desenvolveram e enraizaram no meio foram transferidas para copos contendo solo autoclavado e mantidas em câmara de crescimento em torno de 15 dias. Cada planta foi genotipada

individualmente por PCR e, após confirmação da presença do transgene, foram inoculadas com 1.000 J2pp.

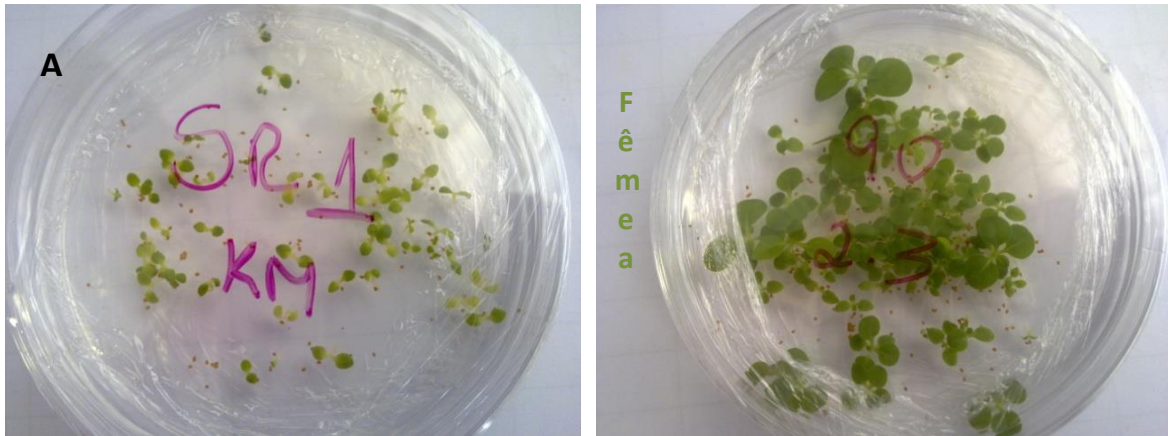


Figura 17: **Germinação de sementes de *Nicotiana tabacum* em meio MS contendo 300 µg/mL de canamicina.** As plantas não transformadas morrem poucos dias após a germinação (A) e as plantas transformadas se desenvolvem normalmente (B).

Foram realizados dois bioensaios para cada construção. O primeiro bioensaio foi realizado com 5 eventos (T1) de transformação independente para cada construção, além das plantas não-transgênicas como controle. Dentro de cada linhagem foram utilizados 5 indivíduos como repetição. O segundo bioensaio foi realizado com 8 eventos (T2) oriundos daqueles que apresentaram os melhores resultados no primeiro bioensaio. Nesse experimento foram utilizados de 8 a 10 indivíduos como repetição. Seis semanas após a inoculação, as raízes das plantas foram coletadas e processadas individualmente para determinação do número de ovos por grama de raiz. Todos os valores dos bioensaios foram relativizados em relação ao tratamento controle (plantas não-transgênicas).

Ao avaliar os dados nematológicos referentes ao silenciamento de Isocitrato liase foi verificado que o número de ovos por grama de raiz foi em média 65% menor nos eventos transgênicos do que no tratamento controle, sendo essa diferença altamente significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,001$). Os eventos transgênicos não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre si (**Figura 18a e 18b**). Estes dados indicam que o gene Isocitrato liase possui função essencial no metabolismo e reprodução do parasita, visto que houve uma grande redução no número de ovos por grama de raiz. Os dados dos bioensaios nos indicam que o silenciamento não afetou a penetração e estabelecimento do sítio de alimentação, o que era esperado, uma vez que esse gene não é considerado um efetor e é pouco expresso nas fases J2/J3/J4 como foi constatado pelos experimentos de qRT-PCR. No entanto, como houve uma grande diminuição do número de ovos depositados pelas fêmeas podemos concluir que o silenciamento alterou de alguma forma o metabolismo da fêmea e, conseqüentemente, a ovoposição. Portanto, o gene-alvo Isocitrato liase tem um grande potencial de ser usado com ferramenta biotecnológica para o controle de fitonematodios em plantas de interesse comercial.

A avaliação dos dados referentes à construção contendo o fragmento gênico de *hsp90* nos mostrou que o número de ovos por grama de raiz foi em média 30% menor nos eventos transgênicos do que no tratamento controle, sendo essa diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Novamente, os eventos transgênicos também não diferem estatisticamente quando comparados entre si (**Figura 19a e 19b**). Os dados indicam que o gene *hsp90* também exerce função essencial no metabolismo e reprodução do nematoide,

no entanto, a redução no número de ovos por grama de raiz foi menor do que nos experimentos utilizando o gene da Isocitrato Liase. Isso provavelmente pode ter ocorrido pelo fato do gene codificador da Proteína de choque térmico 90 apresentar um número maior de *contigs* no genoma de *M. incognita* quando comparado a Isocitrato liase. Provavelmente, o silenciamento do gene *hsp90* foi menos eficiente pelo fato de existir um número maior de cópias no genoma. Consequentemente pode ocorrer uma maior expressão do gene e dessa forma, pode haver uma maior dificuldade de obter um nível satisfatório de silenciamento. No caso do gene Isocitrato liase, como existem apenas dois *contigs* no genoma, o silenciamento pode ter sido mais eficiente e gerado eventos que levaram a uma diminuição muito significativa no número de ovos por grama de raiz.

Portanto, ao escolhermos genes potenciais para realização de experimentos futuros utilizando RNAi *in planta* é interessante que os mesmos sejam preferencialmente de cópia única, facilitando a eficiência do silenciamento. No entanto, novos experimentos utilizando um fragmento menor do gene *hsp90* devem ser conduzidos antes de afirmarmos que o gene não possui possibilidade de aplicação biotecnológica.

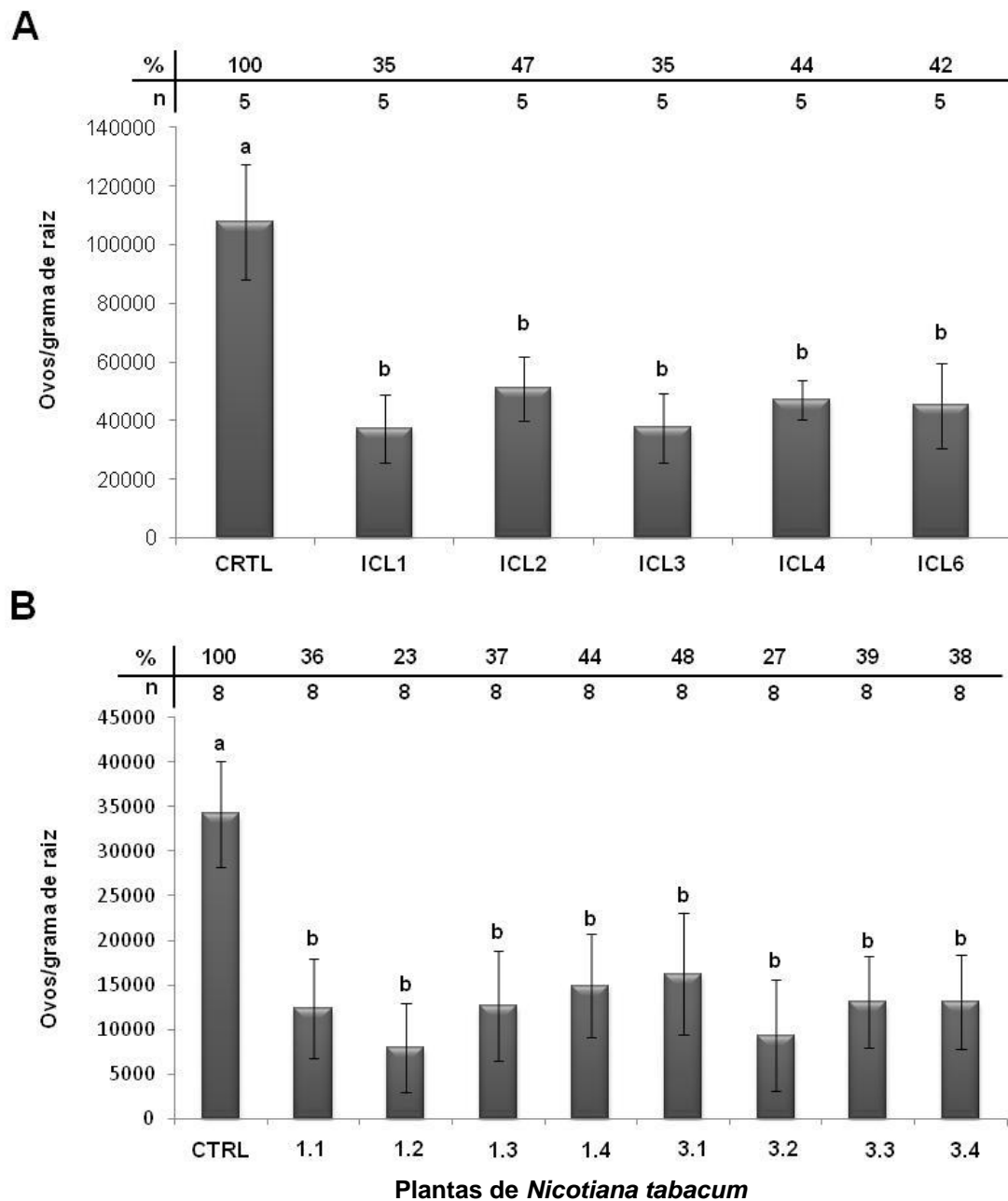


Figura 18: Efeito das plantas expressando dsRNA de Isocitrato Liase na reprodução de *Meloidogyne incognita*. Número de ovos por grama de raiz de *M. incognita* coletados 45 DAI de plantas expressando dsRNA da construção pK7GWIWG2(I)-Isocitrato Liase. **(A)** O primeiro bioensaio foi realizado com 5 linhagens transgênicas diferentes da geração T1. **(B)** O segundo bioensaio foi realizado com 8 linhagens da geração T2 oriundas dos melhores resultados obtidos no primeiro bioensaio. n = número de plantas analisadas por linhagem. % = percentual de número de ovos por grama de raiz. Barras com letras distintas diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,001$).

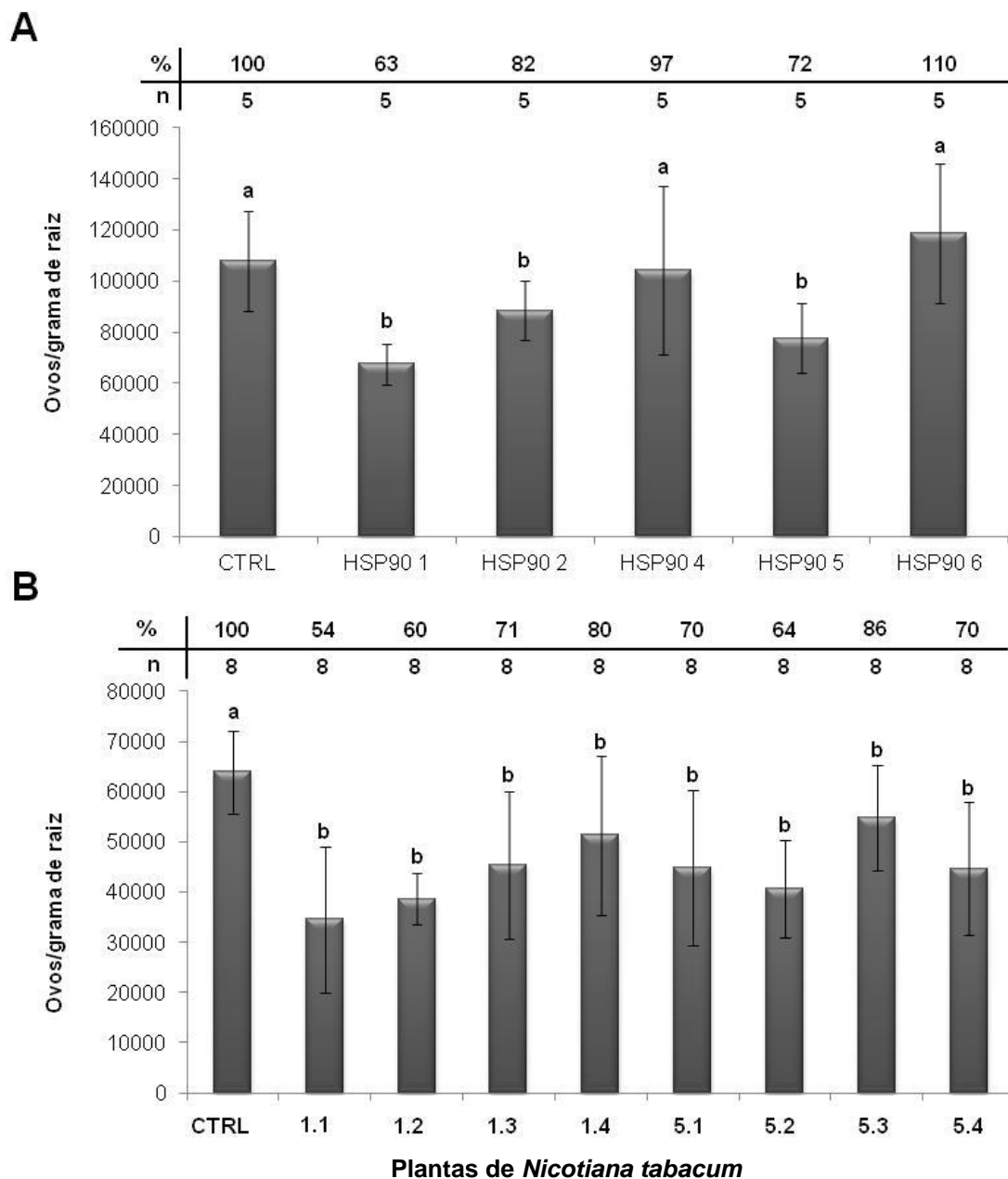


Figura 19: Efeito das plantas expressando dsRNA de *hsp90* na reprodução de *Meloidogyne incognita*. Número de ovos por grama de raiz de *M. incognita* coletados 45 DAI de plantas expressando dsRNA da construção pK7GWIWG2(I)-*hsp90*. **(A)** O primeiro bioensaio foi realizado com 5 linhagens transgênicas diferentes da geração T1. **(B)** O segundo bioensaio foi realizado com 8 linhagens da geração T2 oriundas dos melhores resultados obtidos no primeiro bioensaio. n = número de plantas analisadas por linhagem. % = percentual de número de ovos por grama de raiz. Barras com letras distintas diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.8. Análise da expressão dos transcritos de *hsp90* em ovos recuperados de plantas transgênicas expressando dsRNA

Para analisar silenciamento de *hsp90* na progênie dos nematoides mantidos em plantas GM foi realizado qRT-PCR para determinação do acúmulo de transcritos de *hsp90* de ovos coletados das plantas transgênicas e controle. O RNA total foi extraído de ovos coletados das plantas GM e o cDNA obtido foi utilizado para o experimento de qRT-PCR.

Os resultados obtidos na avaliação do acúmulo de transcritos em ovos obtidos das plantas expressando dsRNA de *hsp90* mostrou uma diminuição significativa na expressão do gene-alvo nos ovos coletados de todas as linhagens, cerca de 7 vezes menos em relação ao controle (**Figura 20**). Dessa forma, pode-se concluir que a técnica de RNAi *in planta* é funcional, visto que houve de fato o silenciamento gênico.

A análise do silenciamento gênico de Isocitrato Liase em ovos não foi possível de ser realizada, visto que a quantidade de ovos obtidos foi muito reduzida. Conseqüentemente, a extração de RNA foi prejudicada e o qRT-PCR também.

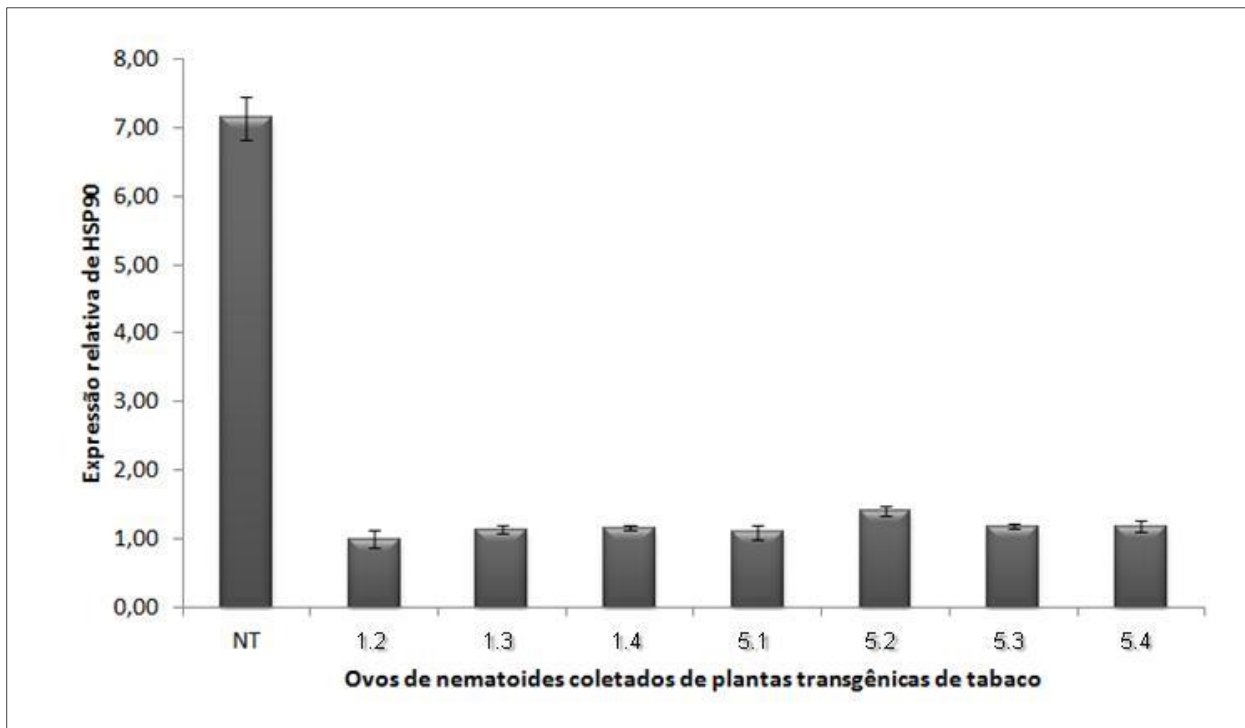


Figura 20: **Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos por qRT-PCR do gene *hsp90* em ovos de *M. incognita* coletados de plantas expressando dsRNA.** Os ovos coletados de todas as linhagens apresentaram diminuição de 7 vezes na expressão do gene *hsp90* mostrando que de fato houve silenciamento e o mesmo pôde ser confirmado na progênie.

6.9. Análise macroscópicas e microscópicas comparativa entre as raízes das plantas expressando dsRNA dos genes-alvo e plantas não-transgênicas

Para avaliação do fenótipo foram utilizados seis eventos independentes de plantas transgênicas da construção pK7ICL, seis eventos independentes da construção pK7*hsp90* e plantas não transgênicas como controle. As análises macroscópicas foram feitas 30 dias após a germinação. As plantas

transformadas não apresentaram nenhuma diferença fenotípica em relação às plantas não transformadas quando não inoculadas por nematoides, mostrando que a inserção dos transgenes não alterou as características das plantas (dados não mostrados).

Adicionalmente, as raízes oriundas de plantas GM e plantas não GM foram comparadas aos 14 dias e 28 dias após a infecção (DAI). Aos 14 DAI, as plantas expressando dsRNA de *hsp90* apresentaram 50% menos galhas por grama de raiz em relação as plantas controle (**Figura 22**). Aos 28 DAI foi observado que não havia diferença significativa para essa característica entre as plantas GM *hsp90* e controle. Isso nos mostra que o silenciamento do gene *hsp90* promoveu um atraso na formação das galhas, mas não impediu a evolução das mesmas ao final do ciclo. O fato de a expressão desse gene ser mais alto nas fases J2/J3/J4, como foi observado nos experimentos de qRT-PCR, pode ser uma explicação para essa alteração. Provavelmente, quando o nematoide formou o sítio de alimentação, a ingestão de dsRNAs provocou uma alteração no metabolismo, retardando a evolução do parasitismo e, conseqüentemente, a formação das galhas.

Ao analisarmos as plantas expressando dsRNA de Isocitrato liase foi observado que em ambos os tempos após a infecção, 14 DAI e 28 DAI, não houve alteração no número de galhas por grama de raiz em comparação com as plantas controle (**Figura 21**). Portanto, podemos concluir que o silenciamento de Isocitrato liase não influenciou na formação da galha. Como foi observado nos experimentos de qRT-PCR dos diferentes estádios dos nematoides, esse gene é pouco expresso nas fases J2/J3/J4, justamente

quando há o estabelecimento do sítio de alimentação e, provavelmente, por isso não houve influência do silenciamento na formação das galhas.

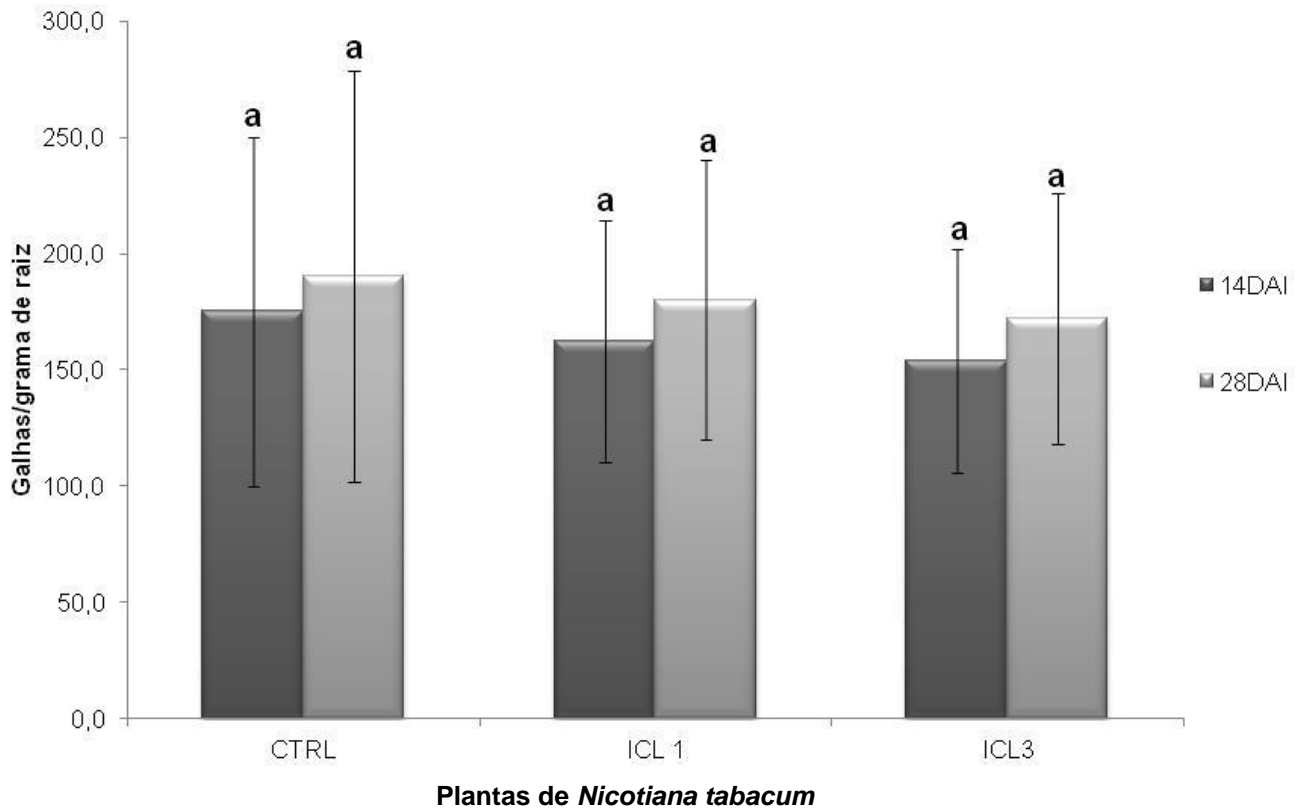


Figura 21: **Número de galhas por grama de raiz (14DAI e 28DAI) das plantas controle e plantas expressando dsRNA de Isocitrato Liase.** As plantas inoculadas com *M. incognita* tiveram suas raízes coletadas e o número de galhas foi contado e comparado com as plantas controle. Foram utilizadas 10 plantas como replicata para cada contagem. As barras indicam o desvio padrão de cada grupo e não foi observada diferença estatística entre os grupos pelo teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$).

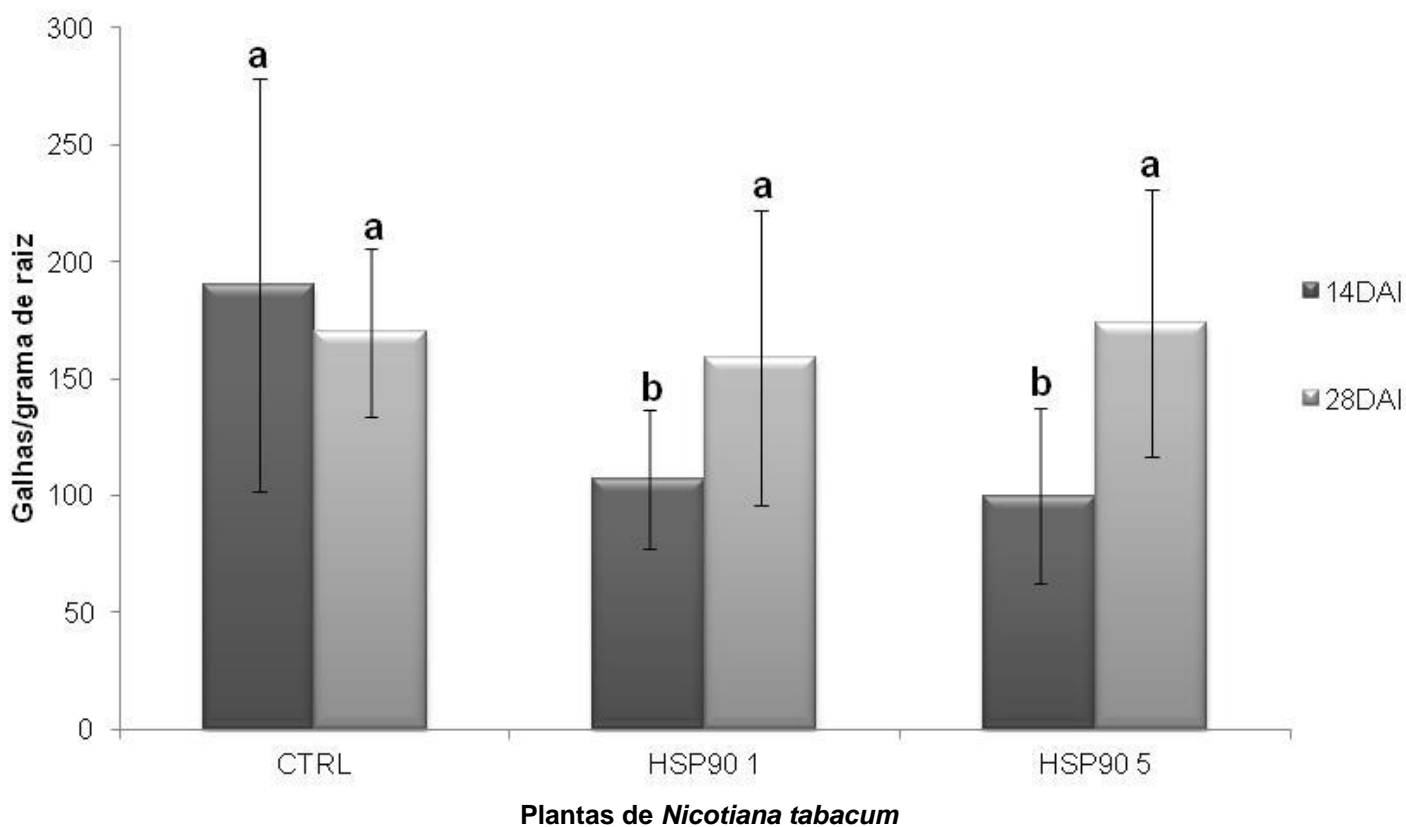


Figura 22: **Número de galhas por grama de raiz (14DAI e 28DAI) das plantas controle e plantas expressando dsRNA *hsp90*.** As plantas inoculadas com *M. incognita* tiveram suas raízes coletadas e o número de galhas foi contado e comparado com as plantas controle. Foram utilizadas 10 plantas como replicata para cada contagem. As barras indicam o desvio padrão de cada grupo e as diferentes letras significam diferença estatística entre os grupos pelo teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$).

Para verificar se existiam diferenças na formação das células gigantes entre as plantas transgênicas expressando dsRNA e plantas controle foi realizada uma análise morfológica das secções dos tecidos radiculares infectados com nematoides. As galhas coletadas individualmente de cada linhagem foram polimerizadas em resina Technovit, cortadas e analisadas por microscopia óptica.

Os parâmetros analisados foram: tamanho das células gigantes, número e tamanho dos núcleos, tamanho dos vacúolos e das células vizinhas. Para ambos os genes-alvo não foram observadas diferenças significativas em nenhum quesito (**Figura 23 e 24**), mostrando que, de fato, não há uma modificação no estabelecimento do parasitismo e do sítio de alimentação, o que é esperado visto que os genes selecionados não estão envolvidos no processo de parasitismo e sim no metabolismo no nematoide.

O silenciamento provavelmente afetou o metabolismo das fêmeas, acarretando em menor ovoposição, uma vez que o número de ovos colocado pelas fêmeas foi menor em ambos os genes-alvo utilizados no presente trabalho.

14 DAI CONTROLE

14 DAI ISOCITRATE LIASE

14 DAI HSP90

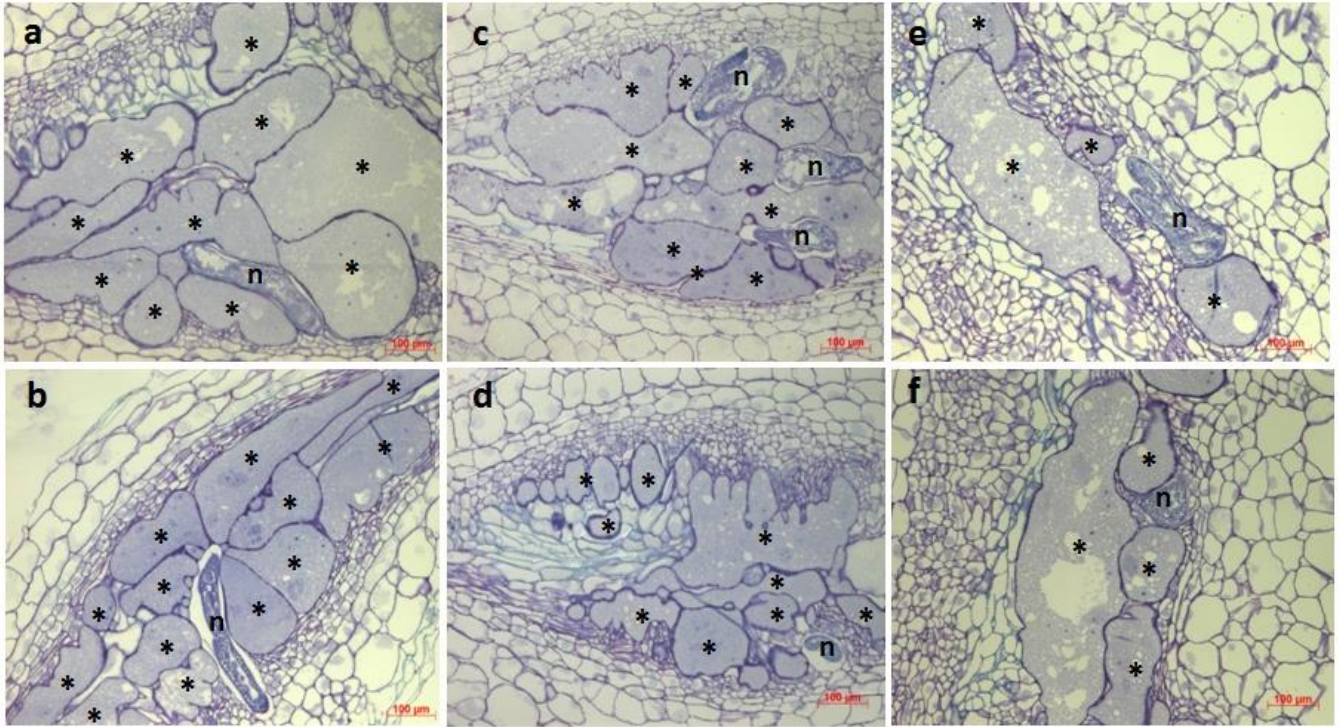


Figura 23: Imagens de campo claro de células gigantes 14 DAI após coloração com azul de toluidina de galhas de raízes de plantas de *Nicotiana tabacum* controles (a e b) e linhagens RNAi Isocitrato Liase (c e d); *hsp90* (e e f). n = nematoide; * = célula gigante e barra = 100 μ m. Não foram observadas diferenças significativas no tamanho das células gigantes, vacúolos, células vizinhas, número e tamanho de núcleos, tamanho dos nematoides.

28 DAI CONTROLE

28 DAI ISOCITRATE LIASE

28 DAI HSP90

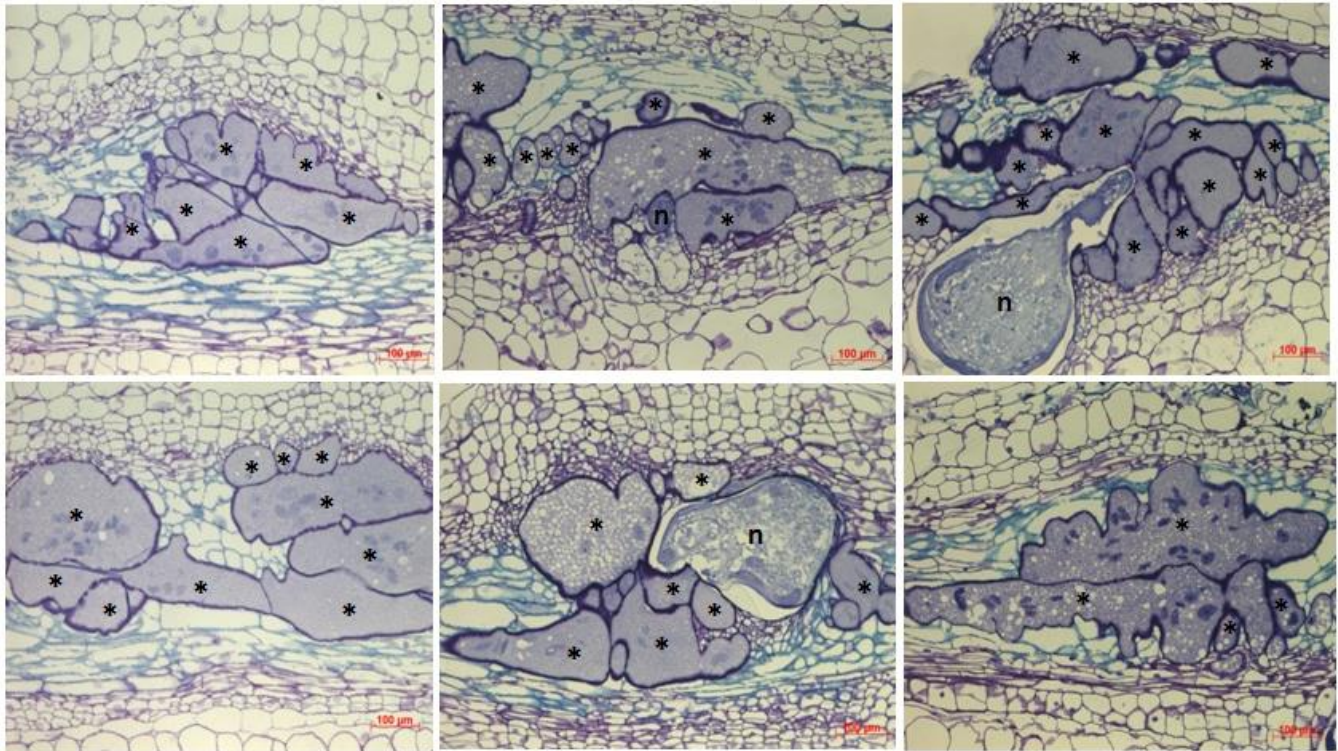


Figura 24: Imagens de campo claro de células gigantes 28 DAI após coloração com azul de toluidina de galhas de raízes de plantas de *Nicotiana tabacum* controles (a e b) e linhagens RNAi Isocitrato Liase (c e d); *hsp90* (e e f). n = nematoide; * = célula gigante e barra = 100 µm. Não foram observadas diferenças significativas no tamanho das células gigantes, vacúolos, células vizinhas, número e tamanho de núcleos, tamanho dos nematoides.

7. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi realizada a validação funcional de genes utilizando a metodologia de RNAi *in planta*. Visando utilizar a metodologia de RNA interferente como uma ferramenta biotecnológica para indução de resistência em plantas GM comercialmente importantes, foram selecionados dois genes considerados essenciais para o fitonematoide *Meloidogyne incognita*. O gene *hsp90* foi selecionado baseado na sua homologia com o ortólogo letal de *C.elegans* e o gene ICL devido a sua importância no metabolismo de lipídeos.

Trabalhos anteriores mostraram os efeitos do silenciamento gênico no desenvolvimento e parasitismo dos fitonematoides utilizando técnica de administração de dsRNA's via soaking, forma mais fácil e rápida de validação de genes. No entanto, essa metodologia não é muito confiável uma vez que a administração do dsRNA é feita apenas em J2 pré parasitas, que não estão em contato com a planta hospedeira e, portanto, não se encontram no seu habitat e condições ideais. Além disso, foi observado em vários estudos utilizando tal metodologia que o efeito do silenciamento não persiste por muito tempo, ou seja, em poucas horas o gene silenciado volta a seus níveis normais de expressão. Portanto, a metodologia de silenciamento *in planta*, utilizada no presente trabalho, é a forma mais confiável e precisa de validação de genes para o fitonematoide *M. incognita*.

7.1- A expressão de dsRNA da proteína de choque térmico 90 atrasa a formação da galha e reduz a reprodução de *Meloidogyne incognita*.

A proteína de choque térmico 90 (HSP90) é essencial e ocorre em todos os eucariotos e seu papel multifuncional está relacionado com o chaperonamento de proteínas envolvidas em transdução de sinal, tais como kinases e fatores de crescimento (PICARD, 2002).

Por ser uma proteína extremamente conservada dentro do filo Nematoda, a análise de *hsp90* se tornou uma ferramenta molecular para diagnóstico de infestação por nematoide e para análises filogenéticas (SKANTAR ;CARTA, 2000). Uma sequência parcial do gene codificador de *HSP90* foi utilizada na identificação de *M. arenaria* (SKANTAR, *et al.*, 2008), *M. floridensis* (HANDOO, *et al.*, 2004), *M. thailandica* (HANDOO, *et al.*, 2005a) e *M. hapla* (HANDOO, *et al.*, 2005b). Utilizando árvores filogenéticas feitas com alinhamento de sequências genômicas de *hsp90*, foi observado que as relações filogenéticas de diversas populações e espécies conhecidas de nematoides parasitas de plantas apresentaram resultados semelhantes às análises realizadas utilizando sequências de genes ribossomais (NISCHWITZ, *et al.*, 2013).

Apesar do alto nível de conservação entre as sequências de *hsp90*, algumas delas possuem a peculiaridade de não se ligarem a geldamicina (GA), um inibidor específico já conhecido. Essa característica de não-ligação foi observada primeiramente em *C. elegans*, mas foi confirmada em *Brugia malayi* (HIM, *et al.*, 2009). Nematoides parasitas obrigatórios, que não possuem fase fora do hospedeiro, ou nematoides parasitas com a fase de vida livre, também

são insensíveis à ligação de GA com *hsp90*. Por outro lado, nematoides parasitas obrigatórios, que não possuem fase de vida fora do hospedeiro, tem suas proteínas *hsp90* ligadas a GA (HIM, *et al.*, 2009). Esses dados nos mostram que essa habilidade de ligação ou não-ligação está associada a história evolutiva do nematoide e que provavelmente houve uma seleção evolutiva positiva, levando à diferenciação entre as espécies de vida livre, parasitas facultativos e parasitas obrigatórios.

A HSP90 é relativamente bem caracterizada em nematoides (DEVANEY, 2011). As proteínas de choque térmico de nematoides são induzidas por uma variedade de fatores bióticos e abióticos (WHARTON, 2011). Essas proteínas podem ser induzidas por exposição ao frio ou por mudança abrupta de temperatura. Quando há uma queda de 37 °C para 4 °C ocorre a produção de HSP70 no primeiro estágio de vida de *Trichinella spiralis*, *Thichinella nativa* e *Trichinella nelsoni*, entretanto, os níveis de HSP60 e HSP90 não são alterados (MARTINEZ, *et al.*, 1999). Uma proteína de 50kDa que co-reage com o anticorpo de HSP90 é induzida por frio e estresse osmótico em *T. spiralis* (MARTINEZ, *et al.*, 2002).

No nematoide modelo e de vida livre *C.elegans* a proteína de choque térmico 90 é codificada por um único gene, *daf-21*. Em estudos anteriores o mRNA se mostrou de 10 a 15 vezes mais expresso em larvas do que nas outras fases do ciclo de vida. Os níveis do mRNA de *daf-21* decresceram rapidamente após estímulo para saírem da fase larval (DALLEY ;GOLOMB, 1992). Estudos subsequentes utilizando diversos métodos de screening confirmaram amplamente esses resultados e mostraram que o gene *daf-21* tem sua expressão aumentada nos estádios de larva (CHERKASOVA, *et al.*, 2000;

MCELWEE, *et al.*, 2003). O silenciamento de *daf-21* por RNAi resultou em significativa diminuição na expectativa de vida em *C.elegans* (MORLEY ;MORIMOTO, 2004). Um grande número de possíveis proteínas que interagem com DAF-21 de *C.elegans* foram identificadas pela técnica de duplo híbrido ou por análise computacional de interação (BIRNBY, *et al.*, 2000). Dois mutantes de *daf-21* foram bem caracterizados. O primeiro deles leva uma mutação pontual (E292K) que resulta em um fenótipo *daf-c* a 25 °C. Esse fenótipo é suprimido na presença de um análogo de cGMP, sugerindo que a proteína DAF-21 deve ser requerida para regular proteínas envolvidas na sinalização de cGMP. A segunda mutação é do tipo perda de função, que resultou no defeito da passagem de larvas no estágio L2 para L3 (GILLAN, *et al.*, 2009). Portanto, *daf-21* é claramente um gene essencial em *C.elegans*, provavelmente pela natureza de suas proteínas clientes.

Diversos estudos investigaram a expressão gênica de *hsp90* em diferentes espécies de nematoides submetidos a variadas condições de estresse. Na espécie de nematoide antártico *Plectus murrayi* a expressão dos genes codificadores de HSP70 e HSP90 não sofreu alteração após estresse hídrico e choque térmico, mostrando que ambas as proteínas foram expressas constitutivamente (ADHIKARI, *et al.*, 2010). Em outros estudos, HSP90 não foi induzida pelo aumento de temperatura nem em *C.elegans* nem em *B. malayi* (THOMPSON, *et al.*, 2001; DEVANEY, *et al.*, 2005b). O silenciamento de HSF-1 em *C. elegans* causou mínimo efeito nos níveis de *hsp90*, em contraste a Hsp16, os quais os níveis decresceram significativamente em larvas que tiveram o gene *hsf-1* silenciado (WALKER, *et al.*, 2003). Entretanto, outros estudos utilizando metodologias diferentes relataram aumento na expressão de

hsp90 em *C.elegans* após um estímulo de choque térmico (INOUE, *et al.*, 2003). O gene de *hsp90* foi clonado em várias outras espécies de nematoides parasitas (HIM, *et al.*, 2009) e foi caracterizado com mais detalhes em nematoides parasitas de planta do gênero *Meloidogyne* (SKANTAR ;CARTA, 2004; DE LUCA, *et al.*, 2009) e em *Trichinella spiralis* (MARTINEZ, *et al.*, 1999). Em *M. artiellia* a *hsp90* é constitutivamente expressa em todos os estádios de vida, mas em níveis um pouco maiores em massa de ovos jovens e em J4. Exposição a baixas temperaturas aumentou sutilmente a expressão de *hsp90* em massas de ovos, mas não alterou em J2 (DE LUCA, *et al.*, 2009). Em geral, o gene codificador de HSP90 geralmente não tem sua expressão alterada sob estresse e pode ser considerada como uma proteína que está sempre expressa. Os nematoides podem ter evoluído um mecanismo para manter a produção de proteínas de choque térmico sem interromper o metabolismo normal ou síntese de outras proteínas.

Os nossos resultados de estudo da expressão de *hsp90* nas diferentes fases de vida de *M. incognita* mostra que o menor acúmulo de transcritos ocorre na fase de J2 pré-parasita e que há um aumento da expressão em 8 vezes na fase parasitária J2/J3/J4. Esse aumento da expressão pode ser associado a mecanismos de defesa da planta contra o nematoide, como estresse oxidativo. Por essa razão, a defesa do hospedeiro pode ser mais danosa e estressante para o nematoide do que certas condições ambientais.

A geração de plantas transgênicas expressando dsRNA de *hsp90* provavelmente provocou o silenciamento do gene no nematoide no início da formação do sítio de alimentação (14DAI) enquanto o J2 parasita se alimentava na célula gigante da planta hospedeira. Curiosamente, o maior número de

transcritos foi observado nas fases J2/J3/J4, justamente quando o sítio de alimentação está sendo estabelecido. Nessa fase (14DAI) também pudemos observar a diminuição do número de galhas por grama de raiz em aproximadamente 60% nas plantas expressando dsRNA de *hsp90*. Dessa forma, a ingestão de dsRNA afetou o metabolismo do nematoide que atrasou o desenvolvimento da galha. Entretanto, ao analisarmos a morfologia das células gigantes formadas não observamos alteração em relação ao controle. As galhas que se desenvolveram produziram fêmeas, no entanto, essas fêmeas tiveram sua ovoposição reduzida em média 30%. Também foi observado uma diminuição de 7 vezes na abundância de transcritos nos ovos provindos dessas fêmeas que se alimentaram de dsRNA de *hsp90*. Portanto, nossos dados sugerem que HSP90 possui papel essencial na atividade metabólica e reprodução do nematoide.

7.2 - A expressão de dsRNA de Isocitrato Liase *in planta* reduz drasticamente o sucesso reprodutivo de *Meloidogyne incognita*.

O ciclo do glioxilato é uma via alternativa onde duas moléculas de Acetil-CoA geram succinato para servir como precursor de carbono. Essa via depende da enzima Isocitrato Liase (ICL), que cliva isocitrato em succinato e glioxilato, e da enzima Malato Sintase (MS), que condensa o Acetil-CoA com succinato para gerar malato, que no ciclo de Krebs gera oxaloacetato que será utilizado na gliconeogênese. O ciclo do glioxilato geralmente está presente em bactérias, protozoários, fungos e plantas. Essa via metabólica é de extrema importância

para organismos que utilizam grandes quantidades de carboidratos como componente estrutural, como por exemplo, a celulose em plantas.

Nematoides são os únicos do Reino Animal que utilizam o ciclo do glioxilato para gerar carboidratos a partir da beta oxidação de ácidos graxos (BARRETT ;WRIGHT, 1998). Estudos observaram que durante a embriogênese nos ovos de *Ascaris* havia a conversão de gordura em carboidrato, evidenciando que realmente nematoides possuem o ciclo do glioxilato funcional (PASSEY ;FAIRBAIRN, 1957). O corpo do nematoide de vida livre *C. elegans* é composto de até 35% de gordura que são as maiores fontes de estoque de energia (COOPER ;VAN GUNDY, 1971; LEE ;ATKINSON, 1976). A síntese de carboidratos durante o desenvolvimento embrionário inicial foi correlacionado com a diminuição dos níveis de lipídeos, quando as atividades de ICL e MS estavam presentes em larvas de *A. lumbricoides* e *C.elegans* (BARRETT, *et al.*, 1970; KHAN ;MCFADDEN, 1982). Foi demonstrado que os corpos lipídicos estavam localizados na região posterior das larvas de *Ascaris suum* (RUBIN ;TRELEASE, 1976), mesma região onde houve aumento de concentração de glicogênio (RUBIN ;TRELEASE, 1975). Essa alta atividade das enzimas do ciclo do glioxilato são necessárias para converter os estoques de lipídeos e gerar energia e glicose, inclusive para eclosão das larvas (BRAECKMAN, *et al.*, 2008). Cooper and van Gundy (1970) observaram que as espécies de *Caenorhabditis* rapidamente metabolizam glicogênio quando estão sem se alimentar, o que sugere que o ciclo do glioxilato também ocorre nos estádios pós embriogênicos (KHAN ;MCFADDEN, 1982). O ciclo de Krebs é menos ativo em larvas jovens do que em adultos (O'RIORDAN ;BURNELL, 1989). Já o ciclo do glioxilato é mais ativo

na fase larval, consistente com a importância das reservas lipídicas (O'RIORDAN ;BURNELL, 1990).

Liu *et al* demonstraram que houve um aumento nos níveis de mRNA e proteína durante as fases iniciais de desenvolvimento do nematoide, com um pico no estágio J2pp que depois decai. Isso significa que o ciclo do glioxilato pode estar envolvido em resistência a estresse nas fases de vida livre (LIU, *et al.*, 1997). Os juvenis 2 pré-parasitas do gênero *Meloidogyne* aparentemente utilizam essa via para produção de energia quando estão fora da planta hospedeira e sem se alimentar, o que evidencia pp metabolizam suas reservas lipídicas para sobrevivência enquanto estão procurando por uma planta hospedeira (REVERSAT, 1981; OPPERMAN, *et al.*, 2008).

Glicogênio e trealose são os maiores constituintes de carboidratos em *A. lumbricoides* (BARRETT, *et al.*, 1970). Algumas evidências sugerem que a trealose resultante da conversão de lipídeo em carboidrato pode proteger nematoides em vida livre de congelamento e dessecação (ASH ;ATKINSON, 1983) e que as maiores taxas de atividade das enzimas do ciclo do glioxilato ocorre nos ovos momentos antes da eclosão tanto em *C. elegans* quanto em *A.lumbricoides* (KHAN ;MCFADDEN, 1982). O acúmulo do dissacarídeo trealose durante a perda de água por organismos anidrobióticos tem sido relatado com frequência e existem diferentes papéis possíveis para a trealose na proteção contra a dessecação (PERRY, 2011), previamente mostrado em larvas não eclodidas de *N. battus* (ASH ;ATKINSON, 1983) e *G. rostochiensis* (PERRY, 1983). O nematoide *P. murrayi* também faz uso do ciclo do glioxilato não somente durante a indução de anidrobiose, mas também para recuperação pós-estresse (ADHIKARI, *et al.*, 2010).

O nematoide de vida livre *C. elegans* possui apenas uma proteína bifuncional do ciclo do glioxilato, que contém dois domínios separados de atividade enzimática de Isocitrato liase e Malato sintase (LIU, *et al.*, 1995). Um ortólogo desse mesmo gene foi encontrado no nematoide parasita *Strongyloides stercoralis*, sugerindo que esse gene bifuncional ICL-MS surgiu da fusão de ambos os genes em um operon de alguma bactéria, antes de ocorrer transferência horizontal para um ancestral comum dos nematoides (KONDRASHOV, *et al.*, 2006). Utilizando buscas em bancos de EST's ortólogos de ICL-MS foram identificados em diversas espécies de fitonematoides, tais como: *Globodera rostochiensis*, *Heterodera glycines*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, e *Meloidogyne incognita*.

As análises *in silico* do banco de EST's dbEST mostraram que J2pp possuem cerca de 5 vezes mais EST do que ovos. Os resultados do qRT-PCR mostraram que em J2pp a expressão de ICL é cerca de 60 vezes maior do que em ovos e nas fases parasitas, o que confirma a importância dessa enzima para o nematoide quando o mesmo se encontra fora da planta hospedeira, sujeito a processos estressantes como frio e seca. O silenciamento de ICL não afetou o número de galhas por grama de raiz nem a formação das células gigantes, o que é justificado pela baixa expressão desse gene durante as fases J2/J3/J4. A localização dos transcritos em corpos lipídicos foi ao longo do intestino e no final da cauda, região com alta concentração de lipídeos. Portanto, o envolvimento de ICL na produção de energia via degradação de lipídeos é suportada pela localização temporal e espacial mostrada nesse trabalho. Os nematoides que se alimentaram nas plantas expressando dsRNA

de ICL colocaram em média 60% menos ovos. Nossos dados indicam que a enzima Isocitrato liase possui função essencial na reprodução de *M. incognita* e de alguma forma o silenciamento afetou a significativamente a ovoposição das fêmeas.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Este trabalho teve como objetivo a validação de dois genes essenciais envolvidos no metabolismo de *Meloidogyne incognita*, Isocitrato Liase e *hsp90*, como ferramenta biotecnológica de controle desse nematoide via transformação genética de plantas para silenciamento gênico.

Foi verificado que a interferência na expressão desses genes provocou redução no sucesso reprodutivo do nematoide, diminuindo o número de ovos depositados, o que foi observado em dois experimentos distintos. Esses dados reforçam a ideia de que esses genes possuem papel fundamental no metabolismo e confirmam o potencial do uso desses genes para o controle desses parasitas. Outro dado relevante é que esse é o primeiro relato sobre silenciamento gênico *in planta* de genes que não são da categoria de efetores ou genes envolvidos no estabelecimento do parasitismo. Foi evidenciado no presente trabalho que as proteínas Isocitrato liase e HSP90 não estão envolvidas com o estabelecimento do sítio de alimentação, mas o silenciamento dos genes codificadores dessas proteínas provavelmente alterou a oogênese nas fêmeas dos nematoides. Os dados gerados nesse trabalho confirmaram a importância do uso de genes essenciais para se conseguir plantas que sejam tolerantes ou resistentes a fitonematoides.

A próxima etapa do trabalho será desenvolver uma construção única envolvendo fragmentos de três genes essenciais diferentes, sob controle de um promotor de forte expressão em galhas, e será realizada a transformação genética de plantas de interesse comercial. De posse de todas essas informações, o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fitonematoides utilizando a biotecnologia para produção de cultivares GM é mais uma ferramenta para o controle de *M. incognita*.

Também foi planejado um cruzamento dos melhores eventos de Isocitrato liase com eventos de *hsp90*, para piramidação desses dois genes-alvo, a fim de se avaliar se ocorre algum efeito sinérgico ou antagônico. Uma vez que as metodologias necessárias para execução dessa tese foram otimizados e implementadas no grupo de pesquisa do LIMPP, novos candidatos de genes-alvo de *M. incognita* estão sendo validados em uma escala dez vezes superior (21 genes-alvo, com perfil de expressão gênica determinado, em fase inicial de transformação).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; CASTAGNONE-SERENO, P., Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular plant pathology**, v. 4, n. 4. p. 217-224. 2003.

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBECH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V. C.; CAILLAUD, M. C.; COUTINHO, P. M.; DASILVA, C.; DE LUCA, F.; DEAU, F.; ESQUIBET, M.; FLUTRE, T.; GOLDSTONE, J. V.; HAMAMOUCHE, N.; HEWEZI, T.; JAILLON, O.; JUBIN, C.; LEONETTI, P.; MAGLIANO, M.; MAIER, T. R.; MARKOV, G. V.; MCVEIGH, P.; PESOLE, G.; POULAIN, J.; ROBINSON-RECHAVI, M.; SALLET, E.; SEGUENS, B.; STEINBACH, D.; TYTGAT, T.; UGARTE, E.; VAN GHELDER, C.; VERONICO, P.; BAUM, T. J.; BLAXTER, M.; BLEVE-ZACHEO, T.; DAVIS, E. L.; EWBANK, J. J.; FAVERY, B.; GRENIER, E.; HENRISSAT, B.; JONES, J. T.; LAUDET, V.; MAULE, A. G.; QUESNEVILLE, H.; ROSSO, M. N.; SCHIEX, T.; SMANT, G.; WEISSENBACH, J.; WINCKER, P., Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 8. p. 909-915. 2008.

ADHIKARI, B. N.; WALL, D. H.; ADAMS, B. J., Effect of slow desiccation and freezing on gene transcription and stress survival of an Antarctic nematode. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 11. p. 1803-1812. 2010.

ALKHAROUF, N. W.; KLINK, V. P.; MATTHEWS, B. F., Identification of *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode [SCN]) cDNA sequences with high identity to those of *Caenorhabditis elegans* having lethal mutant or RNAi phenotypes. v. 115, n. 3. p. 247-258. 2007.

ANTONINO DE SOUZA JUNIOR, J. D.; RAMOS COELHO, R.; TRISTAN LOURENCO, I.; DA ROCHA FRAGOSO, R.; BARBOSA VIANA, A. A.; LIMA PEPINO DE MACEDO, L.; MATTAR DA SILVA, M. C.; GOMES CARNEIRO, R. M.; ENGLER, G.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; GROSSI-DE-SA, M. F., Knocking-Down *Meloidogyne incognita* Proteases by Plant-Delivered dsRNA Has Negative Pleiotropic Effect on Nematode Vigor. **PloS one**, v. 8, n. 12. p. e85364. 2013.

AOKI, K.; MORIGUCHI, H.; YOSHIOKA, T.; OKAWA, K.; TABARA, H., In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. **The EMBO journal**, v. 26, n. 24. p. 5007-5019. 2007.

ASH, C. P. J.; ATKINSON, H. J., Evidence for a temperature-dependent conversion of lipid reserves to carbohydrate in quiescent eggs of the nematode *Nematodirus battus*. v. 76, n. 3. p. 603-610. 1983.

AVELLAR, S. O. C. V., P.S., Evolução do número de pessoas ocupadas na agropecuária brasileira no período de 1990 a 2004. v. 15, n. p. 9-16. 2006.

BADISCO, L.; MARCHAL, E.; VAN WIELENDAELE, P.; VERLINDEN, H.; VLEUGELS, R.; VANDEN BROECK, J., RNA interference of insulin-related peptide and neuroparsins affects vitellogenesis in the desert locust *Schistocerca gregaria*. **Peptides**, v. 32, n. 3. p. 573-580. 2011.

BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.; ATKINSON, H. J.; MCPHERSON, M. J., RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. v. 18, n. 10. p. 1099-1106. 2005.

BAKHETIA, M.; URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J., QPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host. v. 20, n. 3. p. 306-312. 2007.

BALDWIN JG, N. S., WALL DH., Nematodes: pervading the earth and linking all life. In **Nature and Human Society: The Quest for a Sustainable World**, Williams, P. R. a. T., Ed. National Research Council: Washington D.C., pp 176-191. 1999.

BARRETT, J.; WARD, C. W.; FAIRBAIRN, D., The glyoxylate cycle and the conversion of triglycerides to carbohydrates in developing eggs of *Ascaris lumbricoides*. v. 35, n. 3. p. 577-586. 1970.

BARRETT, J.; WRIGHT, D. J., Intermediary metabolism. In **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**, Perry, R. N.; Wright, D. J., Eds. C.A.B. International: Oxford: CABI Publishing, pp 331-353. 1998.

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J., Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11. p. 1322-1326. 2007.

BAUTISTA, M. A.; MIYATA, T.; MIURA, K.; TANAKA, T., RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 1. p. 38-46. 2009.

BENDAHMANE, M.; GRONENBORN, B., Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. **Plant molecular biology**, v. 33, n. 2. p. 351-357. 1997.

BERDICHEVSKY, A.; VISWANATHAN, M.; HORVITZ, H. R.; GUARENTE, L., *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. **Cell**, v. 125, n. 6. p. 1165-1177. 2006.

BIRD, D. M. K., I., Are roots special? Nematodes have their say. . v. 62, n. 2. p. 115-123. 2003.

BIRNBY, D. A.; LINK, E. M.; VOWELS, J. J.; TIAN, H.; COLACURCIO, P. L.; THOMAS, J. H., A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 155, n. 1. p. 85-104. 2000.

BLAXTER ML, D. L. P., GAREY JR, LIU LX, SCHELDAMAN P, VIERSTRAETE A, VANFLETEREN JR, MACKEY LY, DORRIS M, FRISSE LM, VIDA JT, THOMAS WK., A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda., v. 392, n. p. 71-75. 1998.

BONGERS, T.; FERRIS, H., Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. **Trends in ecology & evolution**, v. 14, n. 6. p. 224-228. 1999.

BRAECKMAN, B. P.; HOUTHOOFD, K.; VANFLETEREN, J. R., Intermediary metabolism. In Kuwabara, P., Ed. 2008.

CHAI, X. J.; WANG, P. W.; GUAN, S. Y.; XU, Y. W., [Reducing the maize amylopectin content through RNA interference manipulation]. **Zhi wu sheng li yu fen zi sheng wu xue xue bao = Journal of plant physiology and molecular biology**, v. 31, n. 6. p. 625-630. 2005.

CHARLTON, W. L.; HAREL, H. Y.; BAKHETIA, M.; HIBBARD, J. K.; ATKINSON, H. J.; MCPHERSON, M. J., Additive effects of plant expressed double-stranded RNAs on root-knot nematode development. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 7. p. 855-864. 2010.

CHEN, Q.; REHMAN, S.; SMANT, G.; JONES, J. T., Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi. v. 18, n. 7. p. 621-625. 2005.

CHERKASOVA, V.; AYYADEVARA, S.; EGILMEZ, N.; SHMOOKLER REIS, R., Diverse *Caenorhabditis elegans* genes that are upregulated in dauer larvae also show elevated transcript levels in long-lived, aged, or starved adults. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 3. p. 433-448. 2000.

CIGAN, A. M.; UNGER-WALLACE, E.; HAUG-COLLET, K., Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 43, n. 6. p. 929-940. 2005.

CONTINI, E. G., J.G.; LEONARDI, R.B.A.; BASTOS, E.T., Evolução recente e tendências do agronegócio. v. 15, n. p. 5-28. 2006a.

CONTINI, E. G., J.G.; LEONARDI, R.B.A.; BASTOS, E.T., Projeções do agronegócio no Brasil. v. 15, n. p. 57-81. 2006b.

COOPER, A. F.; VAN GUNDY, S. D., Ethanol production and utilization by *Aphelenchus avenae* and *Caenorhabditis* sp. **Journal of nematology**, v. 3, n. 3. p. 205-214. 1971.

DALLEY, B. K.; GOLOMB, M., Gene expression in the *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental regulation of Hsp90 and other genes. **Developmental biology**, v. 151, n. 1. p. 80-90. 1992.

DALZELL, J. J.; MCVEIGH, P.; WARNOCK, N. D.; MITREVA, M.; BIRD, D. M.; ABAD, P.; FLEMING, C. C.; DAY, T. A.; MOUSLEY, A.; MARKS, N. J.; MAULE, A. G., RNAi effector diversity in nematodes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6. p. e1176. 2011.

DAVULURI, G. R.; VAN TUINEN, A.; FRASER, P. D.; MANFREDONIA, A.; NEWMAN, R.; BURGESS, D.; BRUMMELL, D. A.; KING, S. R.; PALYS, J.; UHLIG, J.; BRAMLEY, P. M.; PENNINGS, H. M.; BOWLER, C., Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 7. p. 890-895. 2005.

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

DE LEY, P.; BLAXTER, M., Systematic position and phylogeny. In **The Biology of Nematodes.**, Lee, D., Ed. Taylor & Francis: London, pp 1-30. 2002.

DE LEY P, D. W., EYUALEM-ABEBE W., Introduction: summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. In **Freshwater nematodes: ecology and taxonomy**, W Eyualem-Abebe, W. T., I Andr assy, Ed. CABI: Wallingford, UK, pp 3-30. 2006.

DE LUCA, F.; DI VITO, M.; FANELLI, E.; REYES, A.; GRECO, N.; DE GIORGI, C., Characterization of the heat shock protein 90 gene in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia* and its expression as related to different developmental stages and temperature. **Gene**, v. 440, n. 1-2. p. 16-22. 2009.

DEVANEY, E., Thermobiotic survival. In **Molecular and physiological basis of nematode survival**, PERRY, R. N.; WHARTON, D. A., Eds. pp 233-255. 2011.

DEVANEY, E.; O'NEILL, K.; HARNETT, W.; WHITESELL, L.; KINNAIRD, J. H., Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 6. p. 627-636. 2005a.

DEVANEY, E.; O'NEILL, K.; HARNETT, W.; WHITESELL, L.; KINNAIRD, J. H., Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. v. 35, n. 6. p. 627-636. 2005b.

DHANKHER, O. P.; ROSEN, B. P.; MCKINNEY, E. C.; MEAGHER, R. B., Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, n. 14. p. 5413-5418. 2006.

DU, S. J.; LI, H.; BIAN, Y.; ZHONG, Y., Heat-shock protein 90alpha1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2. p. 554-559. 2008.

DUBREUIL, G.; MAGLIANO, M.; DELEURY, E.; ABAD, P.; ROSSO, M. N., Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. **The New phytologist**, v. 176, n. 2. p. 426-436. 2007.

EADY, C. C.; KAMOI, T.; KATO, M.; PORTER, N. G.; DAVIS, S.; SHAW, M.; KAMOI, A.; IMAI, S., Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile. **Plant physiology**, v. 147, n. 4. p. 2096-2106. 2008.

EHWAETI, M. E.; FARGETTE, M.; PHILLIPS, M. S.; TRUDGILL, D. L., Host status differences and their relevance to damage by *Meloidogyne incognita*., v. 1, n. p. 421-432. 1999.

ESCOBAR, M. A.; CIVEROLO, E. L.; SUMMERFELT, K. R.; DANDEKAR, A. M., RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23. p. 13437-13442. 2001.

FAIRBAIRN, D. J.; CAVALLARO, A. S.; BERNARD, M.; MAHALINGA-IYER, J.; GRAHAM, M. W.; BOTELLA, J. R., Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. v. 226, n. 6. p. 1525-1533. 2007.

FANELLI, E.; DI VITO, M.; JONES, J. T.; DE GIORGI, C., Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. v. 349, n. p. 87-95. 2005.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.; KOSTAS, S.; DRIVER, S.; MELLO, C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. v. 391, n. p. 806 - 811. 1998.

FRAGOSO, R. R. **Pospecção de moléculas-alvo para a intervenção da interação planta-praga**. Universidade de Brasília

2006a.

FRAGOSO, R. R. **Prospecção de moléculas-alvo para intervenção da interação planta-praga**. . Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, 2006b.

FUDALI, S.; SOBCZAK, M.; JANAKOWSKI, S.; GRIESSER, M.; GRUNDLER, F. M.; GOLINOWSKI, W., Expansins are among plant cell wall modifying agents specifically expressed during

development of nematode-induced syncytia. **Plant signaling & behavior**, v. 3, n. 11. p. 969-971. 2008.

GAISER, A. M.; KAISER, C. J.; HASLBECK, V.; RICHTER, K., Downregulation of the Hsp90 system causes defects in muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. **PLoS one**, v. 6, n. 9. p. e25485. 2011.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C., Gene expression in nematode feeding sites. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. p. 191-219. 2002.

GHEYSEN, G.; VANHOLME, B., RNAi from plants to nematodes. v. 25, n. 3. p. 89-92. 2007.

GILLAN, V.; MAITLAND, K.; MCCORMACK, G.; HIM, N. A.; DEVANEY, E., Functional genomics of hsp-90 in parasitic and free-living nematodes. v. 39, n. 10. p. 1071-1081. 2009.

GRIEBLER, M.; WESTERLUND, S. A.; HOFFMANN, K. H.; MEYERING-VOS, M., RNA interference with the allatopregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 6. p. 997-1007. 2008.

HANDOO, Z. A.; NYCZEPIR, A. P.; ESMENJAUD, D.; VAN DER BEEK, J. G.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARTA, L. K.; SKANTAR, A. M.; HIGGINS, J. A., Morphological, Molecular, and Differential-Host Characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a Root-Knot Nematode Parasitizing Peach in Florida. **Journal of nematology**, v. 36, n. 1. p. 20-35. 2004.

HANDOO, Z. A.; SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K.; ERBE, E. F., Morphological and Molecular Characterization of a New Root-Knot Nematode, *Meloidogyne thailandica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), Parasitizing Ginger (*Zingiber* sp.). **Journal of nematology**, v. 37, n. 3. p. 343-353. 2005a.

HANDOO, Z. A.; SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K.; SCHMITT, D. P., Morphological and Molecular Evaluation of a *Meloidogyne hapla* Population Damaging Coffee (*Coffea arabica*) in Maui, Hawaii. **Journal of nematology**, v. 37, n. 2. p. 136-145. 2005b.

HESSLING, M.; RICHTER, K.; BUCHNER, J., Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, n. 3. p. 287-293. 2009.

HIM, N. A.; GILLAN, V.; EMES, R. D.; MAITLAND, K.; DEVANEY, E., Hsp-90 and the biology of nematodes. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. p. 254. 2009.

HIRAI, S.; OKA, S.; ADACHI, E.; KODAMA, H., The effects of spacer sequences on silencing efficiency of plant RNAi vectors. **Plant cell reports**, v. 26, n. 5. p. 651-659. 2007.

HORIGUCHI, G., RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 72, n. 2-3. p. 65-73. 2004.

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

HUGOT J-P, B. P., MORAND S., Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview., v. 3, n. p. 199-208. 2001.

HUSSEY, R. S.; BARKER, A. A., Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. . v. 57, n. p. 1025-1028. 1973.

HUSSEY, R. S. B., A. A., , Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique., v. 57, n. p. 1025-1028. 1973.

IBRAHIM, H. M.; ALKHAROUF, N. W.; MEYER, S. L.; ALY, M. A.; GAMAL EL-DIN AEL, K.; HUSSEIN, E. H.; MATTHEWS, B. F., Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1. p. 90-99. 2011.

INOUE, T.; TAKAMURA, K.; YAMAE, H.; ISE, N.; KAWAKAMI, M.; TABUSE, Y.; MIWA, J.; YAMAGUCHI, Y., *Caenorhabditis elegans* DAF-21 (HSP90) is characteristically and predominantly expressed in germline cells: spatial and temporal analysis. **Development, growth & differentiation**, v. 45, n. 4. p. 369-376. 2003.

JEPSON, B. S., **Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. CAB Int.: Wallingford, UK, Vol. p 265. 1987.

JEYARATNAM, J., Acute pesticide poisoning: a major global health problem., v. 43, n. 3. p. 139-144. 1990.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C. A., Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant molecular biology**, v. 31, n. 5. p. 957-973. 1996.

KAPOOR, S.; KOBAYASHI, A.; TAKATSUJI, H., Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia. **The Plant cell**, v. 14, n. 10. p. 2353-2367. 2002.

KATOCH, R.; THAKUR, N., RNA interference: a promising technique for the improvement of traditional crops. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. 2. p. 248-259. 2013.

KHAN, F. R.; MCFADDEN, B. A., *Caenorhabditis elegans*: decay of isocitrate lyase during larval development. **Experimental parasitology**, v. 54, n. 1. p. 47-54. 1982.

KIMBER, M. J.; MCKINNEY, S.; MCMASTER, S.; DAY, T. A.; FLEMING, C. C.; MAULE, A. G., flp gene disruption in a parasitic nematode reveals motor dysfunction and unusual neuronal sensitivity to RNA interference. v. 21, n. 4. p. 1233-1243. 2007.

KLINK, V. P.; KIM, K. H.; MARTINS, V.; MACDONALD, M. H.; BEARD, H. S.; ALKHAROUF, N. W.; LEE, S. K.; PARK, S. C.; MATTHEWS, B. F., A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. **Planta**, v. 230, n. 1. p. 53-71. 2009.

KONDRASHOV, F.; KOONIN, E.; MORGUNOV, I.; FINOGENOVA, T.; KONDRASHOVA, M., Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. v. 1, n. 1. p. 31. 2006.

KUMAR, M.; GUPTA, G. P.; RAJAM, M. V., Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. **Journal of insect physiology**, v. 55, n. 3. p. 273-278. 2009.

KUSABA, M.; MIYAHARA, K.; IIDA, S.; FUKUOKA, H.; TAKANO, T.; SASSA, H.; NISHIMURA, M.; NISHIO, T., Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. **The Plant cell**, v. 15, n. 6. p. 1455-1467. 2003.

LAMBSHEAD, J., Recent developments in marine benthic biodiversity research., v. 19, n. p. 5-24. 1993.

LEE, D. L.; ATKINSON, H. J., **Physiology of Nematodes**. Vol. 1976.

LI, J.; TODD, T. C.; LEE, J.; TRICK, H. N., Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control. **Plant biotechnology journal**, v. 9, n. 9. p. 936-944. 2011.

LI, J.; TODD, T. C.; OAKLEY, T. R.; LEE, J.; TRICK, H. N., Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe. **Planta**, v. 232, n. 3. p. 775-785. 2010a.

LI, J.; TODD, T. C.; TRICK, H. N., Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. **Plant cell reports**, v. 29, n. 2. p. 113-123. 2010b.

LILLEY, C. J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W. L.; URWIN, P. E., Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. v. 8, n. 5. p. 701-711. 2007.

LILLEY, C. J.; DAVIES, L. J.; URWIN, P. E., RNA interference in plant parasitic nematodes: a summary of the current status. **Parasitology**, v., n. p. 1-11. 2012.

LILLEY, C. J.; GOODCHILD, S. A.; ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E., Cloning and characterisation of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 14. p. 1577-1585. 2005.

LIU, F.; THATCHER, J. D.; BARRAL, J. M.; EPSTEIN, H. F., Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditis elegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle. **Developmental biology**, v. 169, n. 2. p. 399-414. 1995.

LIU, F.; THATCHER, J. D.; EPSTEIN, H. F., Induction of glyoxylate cycle expression in *Caenorhabditis elegans*: a fasting response throughout larval development. **Biochemistry**, v. 36, n. 1. p. 255-260. 1997.

LIU, Q.; SINGH, S. P.; GREEN, A. G., High-stearic and High-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant physiology**, v. 129, n. 4. p. 1732-1743. 2002.

MAO, Y. B.; CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANG, Y. P.; CHEN, X. Y., Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11. p. 1307-1313. 2007.

MARTINEZ, J.; PEREZ-SERRANO, J.; BERNADINA, W. E.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F., In vitro stress response to elevated temperature, hydrogen peroxide and mebendazole in *Trichinella spiralis* muscle larvae. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 9. p. 1457-1464. 1999.

MARTINEZ, J.; PEREZ-SERRANO, J.; BERNADINA, W. E.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F., Oxidative and cold shock cause enhanced induction of a 50 kDa stress protein in *Trichinella spiralis*. **Parasitology research**, v. 88, n. 5. p. 427-430. 2002.

MATTHEWS, B. F.; MACDONALD M. H.; THAI V. K.; L., T. M., Molecular Characterization of Arginine Kinases in the Soybean Cyst (*Heterodera glycines*). v. 35, n. 3. p. 252-258. 2003.

MCCARTER, J. P.; MITREVA, M. D.; MARTIN, J.; DANTE, M.; WYLIE, T.; RAO, U.; PAPE, D.; BOWERS, Y.; THEISING, B.; MURPHY, C. V.; KLOEK, A. P.; CHIAPELLI, B. J.; CLIFTON, S. W.; BIRD,

D. M.; WATERSTON, R. H., Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. **Genome biology**, v. 4, n. 4. p. R26. 2003.

MCELWEE, J.; BUBB, K.; THOMAS, J. H., Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. **Aging cell**, v. 2, n. 2. p. 111-121. 2003.

ML., D. L. P. B., Systematic position and phylogeny. In **The Biology of Nematodes** Francis, T. a., Ed. ed. DL Lee: London, pp 1-30. 2002.

MORLEY, J. F.; MORIMOTO, R. I., Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 2. p. 657-664. 2004.

MUIR, S. R.; COLLINS, G. J.; ROBINSON, S.; HUGHES, S.; BOVY, A.; RIC DE VOS, C. H.; VAN TUNEN, A. J.; VERHOEYEN, M. E., Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 5. p. 470-474. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F., A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures., v. 15, n. p. 473-497. 1962.

MURPHY, C. T.; MCCARROLL, S. A.; BARGMANN, C. I.; FRASER, A.; KAMATH, R. S.; AHRINGER, J.; LI, H.; KENYON, C., Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946. p. 277-283. 2003.

NG'AMBI, T. B.; RUFTY, R. C.; BARKER, K. R.; MELTON, T. A., Identification of Sources of Resistance to Four Species of Root-knot Nematodes in Tobacco. **Journal of nematology**, v. 31, n. 3. p. 272-282. 1999.

NISCHWITZ, C.; SKANTAR, A.; HANDOO, Z. A.; HULT, M. N.; SCHMITT, M. E.; MCCLURE, M. A., Occurrence of *Meloidogyne fallax* in North America, and Molecular Characterization of *M. fallax* and *M. minor* from U.S. Golf Course Greens. v. 97, n. 11. p. 1424-1430. 2013.

NISHIHARA, M.; NAKATSUKA, T.; YAMAMURA, S., Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. **FEBS letters**, v. 579, n. 27. p. 6074-6078. 2005.

NORIS, E.; LUCIOLI, A.; TAVAZZA, R.; CACIAGLI, P.; ACCOTTO, G. P.; TAVAZZA, M., Tomato yellow leaf curl Sardinia virus can overcome transgene-mediated RNA silencing of two essential viral genes. **The Journal of general virology**, v. 85, n. Pt 6. p. 1745-1749. 2004.

NUNES, F. M.; SIMOES, Z. L., A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 2. p. 157-160. 2009.

O'RIORDAN, V. B.; BURNELL, A. M., Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*— 1. Glycolysis, gluconeogenesis, oxidative phosphorylation and the tricarboxylic acid cycle. v. 92, n. 2. p. 233-238. 1989.

O'RIORDAN, V. B.; BURNELL, A. M., Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*—II. The glyoxylate cycle and fatty-acid oxidation. v. 95, n. 1. p. 125-130. 1990.

OBBARD, D. J.; GORDON, K. H.; BUCK, A. H.; JIGGINS, F. M., The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1513. p. 99-115. 2009.

OGITA, S.; UEFUJI, H.; MORIMOTO, M.; SANO, H., Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. **Plant molecular biology**, v. 54, n. 6. p. 931-941. 2004.

OPPERMAN, C. H.; BIRD, D. M.; WILLIAMSON, V. M.; ROKHSAR, D. S.; BURKE, M.; COHN, J.; CROMER, J.; DIENER, S.; GAJAN, J.; GRAHAM, S.; HOUFEK, T. D.; LIU, Q.; MITROS, T.; SCHAFF, J.; SCHAFFER, R.; SCHOLL, E.; SOSINSKI, B. R.; THOMAS, V. P.; WINDHAM, E., Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. v. 105, n. 39. p. 14802-14807. 2008.

PAPOLU, P. K.; GANTASALA, N. P.; KAMARAJU, D.; BANAKAR, P.; SREEVATHSA, R.; RAO, U., Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, flp-14 and flp-18, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **PloS one**, v. 8, n. 11. p. e80603. 2013.

PASSEY, R. F.; FAIRBAIRN, D., The conversion of fat to carbohydrate during embryonation of *Ascaris* eggs. v. 35, n. 7. p. 511-525. 1957.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C., Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annual review of biochemistry**, v. 75, n. p. 271-294. 2006.

PERRY, R. N., The effect of potato root diffusate on the desiccation survival of unhatched juveniles of *Globodera rostochiensis*. v. 6, n. p. 99-102. 1983.

PERRY, R. N. M., M., Survival of parasitic nematodes outside the host. In **Molecular and physiological basis of nematode survival**, Perry, R. N. W., D. A., Ed. pp 1-27. 2011.

PFÄFFL, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9. p. e45. 2001.

PIANO, F.; SCHETTER, A. J.; MANGONE, M.; STEIN, L.; KEMPHUES, K. J., RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. v. 10, n. 24. p. 1619-1622. 2000.

PICARD, D., Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. v. 59, n. 10. p. 1640-1648. 2002.

PLATT, H. M., The phylogenetic systematics of free-living nematodes. In **Foreward.**, Lorenzen, S., Ed. The Ray Society: London. 1999.

POGGIN, M.; SHIVAPRASAD, P. V.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T., RNAi targeting of DNA virus in plants. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 2. p. 131-132. 2003.

PRICE, D. R.; GATEHOUSE, J. A., RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 7. p. 393-400. 2008.

REGINA, A.; BIRD, A.; TOPPING, D.; BOWDEN, S.; FREEMAN, J.; BARSBY, T.; KOSAR-HASHEMI, B.; LI, Z.; RAHMAN, S.; MORELL, M., High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10. p. 3546-3551. 2006.

REVERSAT, G., Consumption of food reserves by starved second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions including osmobiosis. v. 27, n. p. 207-214. 1981.

RIDDLE, D. L., Ageing. A message from the gonads. **Nature**, v. 399, n. 6734. p. 308-309. 1999.

ROSSO, M. N.; JONES, J. T.; ABAD, P., RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes. v. 47, n. p. 207-232. 2009.

RUBIN, H.; TRELEASE, R. N., Ultrastructure of developing *Ascaris* larvae undergoing lipid to carbohydrate interconversion. **The Journal of parasitology**, v. 61, n. 4. p. 577-588. 1975.

RUBIN, H.; TRELEASE, R. N., Subcellular localization of glyoxylate cycle enzymes in *Ascaris suum* larvae. **The Journal of cell biology**, v. 70, n. 2 pt 1. p. 374-383. 1976.

RUTHERFORD, S. L.; LINDQUIST, S., Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. **Nature**, v. 396, n. 6709. p. 336-342. 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T., **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Second ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, Vol. 1989.

SASSER, J. N., Root-knot nematodes: a global menace to crop production., v. 64, n. p. 36-41. 1980.

SASSER, J. N.; EISENBACK, J. D.; CARTER, C. C., The international *Meloidogyne* project - its goals and achievements., v. 21, n. p. 271-288. 1983.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W., A world perspective on nematology:the role of the society. In **Vistas on Nematology**, Veech, J. A.; Dickerson, D. W., Eds. Society of Nematologists: Hyatsville, USA, pp 7-14. 1987.

SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J., A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, v. 165, n. 1. p. 387-397. 2003.

SHINGLES, J.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E., *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. v. 115, n. 2. p. 114-120. 2007.

SINDHU, A. S.; MAIER, T. R.; MITCHUM, M. G.; HUSSEY, R. S.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J., Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. v. 60, n. 1. p. 315-324. 2009.

SKANTAR, A.; CARTA, L.; HANDOO, Z., Molecular and Morphological Characterization of an Unusual *Meloidogyne arenaria* Population from Traveler's Tree, *Ravenala madagascariensis*. **Journal of nematology**, v. 40, n. 3. p. 179-189. 2008.

SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K., Amplification of Hsp90 homologs from plant-parasitic nematodes using degenerate primers and ramped annealing PCR. **BioTechniques**, v. 29, n. 6. p. 1182-1184, 1186. 2000.

SKANTAR, A. M.; CARTA, L. K., Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the hsp90 gene from selected nematodes. **Journal of nematology**, v. 36, n. 4. p. 466-480. 2004.

SMITH, N. A.; SINGH, S. P.; WANG, M. B.; STOUTJESDIJK, P. A.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE, P. M., Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, v. 407, n. 6802. p. 319-320. 2000.

SOTO, M. C.; QADOTA, H.; KASUYA, K.; INOUE, M.; TSUBOI, D.; MELLO, C. C.; KAIBUCHI, K., The GEX-2 and GEX-3 proteins are required for tissue morphogenesis and cell migrations in *C. elegans*. **Genes & development**, v. 16, n. 5. p. 620-632. 2002.

STEEVES RM, T. T., ESSIG JS, TRICK HN, Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. v. 33, n. 11. p. 991-999. 2006.

SUNILKUMAR, G.; CAMPBELL, L. M.; PUCKHABER, L.; STIPANOVIC, R. D.; RATHORE, K. S., Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 48. p. 18054-18059. 2006.

TENLLADO, F.; MARTINEZ-GARCIA, B.; VARGAS, M.; DIAZ-RUIZ, J. R., Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC biotechnology**, v. 3, n. p. 3. 2003.

THAO, N. P.; CHEN, L.; NAKASHIMA, A.; HARA, S.; UMEMURA, K.; TAKAHASHI, A.; SHIRASU, K.; KAWASAKI, T.; SHIMAMOTO, K., RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice. **The Plant cell**, v. 19, n. 12. p. 4035-4045. 2007.

THOMPSON, F. J.; COCKROFT, A. C.; WHEATLEY, I.; BRITTON, C.; DEVANEY, E., Heat shock and developmental expression of hsp83 in the filarial nematode *Brugia pahangi*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 22. p. 5808-5815. 2001.

TRUDGILL, D. L., Origins of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp. Nematoda) in relation to their cultural control., v. 23, n. p. 191-194. 1995.

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

TURNER, C. T.; DAVY, M. W.; MACDIARMID, R. M.; PLUMMER, K. M.; BIRCH, N. P.; NEWCOMB, R. D., RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect molecular biology**, v. 15, n. 3. p. 383-391. 2006.

URWIN, P.; LILLEY, C.; ATKINSON, H., Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. v. 15, n. p. 747 - 752. 2002.

VAN DER EYCKEN, W.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G., A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. v. 9, n. 1. p. 45-54. 1996.

VOINNET, O., RNA silencing as a plant immune system against viruses. v. 17, n. 8. p. 449-459. 2001.

WALKER, G. A.; THOMPSON, F. J.; BRAWLEY, A.; SCANLON, T.; DEVANEY, E., Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in *Caenorhabditis elegans*. v. 17, n. 13. p. 1960-1962. 2003.

WALSHE, D. P.; LEHANE, S. M.; LEHANE, M. J.; HAINES, L. R., Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. **Insect molecular biology**, v. 18, n. 1. p. 11-19. 2009.

WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M. B., Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23. p. 13959-13964. 1998.

WATERHOUSE, P. M.; WANG, M. B.; LOUGH, T., Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v. 411, n. 6839. p. 834-842. 2001.

WHARTON, D. A., Cold tolerance. In **Molecular and physiological basis of nematode survival**, Perry, R. N. W., D. A., Ed. pp 182-204. 2011.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S., Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 11. p. 824-832. 2009.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A., Plant-nematode interactions. **Curr Opin Plant Biol**
Curr Opin Plant Biol, v. 6, n. 4. p. 327-333. 2003.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A., Nematode resistance in plants: the battle underground. v. 22, n. 7. p. 396-403. 2006.

WILSON, Z. A.; MORROLL, S. M.; DAWSON, J.; SWARUP, R.; TIGHE, P. J., The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 28, n. 1. p. 27-39. 2001.

YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K.; SUBRAMANIAM, K., Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. v. 148, n. 2. p. 219-222. 2006.

YEATES, G. W.; BONGERS, T.; DE GOEDE, R. G.; FRECKMAN, D. W.; GEORGIEVA, S. S., Feeding habits in soil nematode families and genera-an outline for soil ecologists. **Journal of nematology**, v. 25, n. 3. p. 315-331. 1993.

ZHANG, P.; VANDERSCHUREN, H.; FUTTERER, J.; GRUISSEM, W., Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. **Plant biotechnology journal**, v. 3, n. 4. p. 385-397. 2005.

ZHAO, M. M.; AN, D. R.; ZHAO, J.; HUANG, G. H.; HE, Z. H.; CHEN, J. Y., Transiently expressed short hairpin RNA targeting 126 kDa protein of tobacco mosaic virus interferes with virus infection. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 38, n. 1. p. 22-28. 2006.

ZHOU, X.; WHEELER, M. M.; OI, F. M.; SCHARF, M. E., RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 8. p. 805-815. 2008.

ANEXOS

Tabela Anexo: Lista de primers utilizados

Nome	Foward Sequência (5'-3')	Reverso Sequência (5'-3')	Tm
ICL_qPCR	ATCCAATTCCCTTGGAGAGG	ACTGCACCAAAGGGTCGTTA	60
HSP90_qPCR	ATCCGTAAGTGC GTTGATCC	CATCCTCAGCCTCATCATCA	60
GAPDH_qPCR	GCTTCCTGCACTACTAATTGTCTTG	CAGTAACAGCGTGTACAGTAGTCAT	60
Elongation Factor_qPCR	GGAAAAGAAAAGATCCATATCAACATT	TGCCAGTGTTGTGGATTT	60
18S rRNA_qPCR	ACTTGACGGGAGCATAATCG	CGGCCTCAAAGAGAACAGTC	60
B-tubulin_qPCR	TGGAAAGTATGTCCCAAGAGC	CACCACCAAGCGAGTGAGT	60
ICL_Mi	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTATA TGTAAGTATAATCTCC	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTGGTATATGTAAGTATAATCTCC	72
HSP90_Mi	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCCA GTTGTGTCCTTGATC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTGCTCACCGTCATTC	77

>Sequência consenso Isocitrato Liase (MiV1ctg646, MiV1ctg348)

gcgggttctatттаacaacaaaaaaATGTCACAGACTATCGCCAAAAATTTTTATCAAGTGGTAAAGACTGCACCAAAGGGTCGTTACAAGGGAATTAAACGAAATTATGAAGTTG
AGGATTTGTTGAAATTGAGAGGATCTATTGATATTGAGTAAAGAATAGATATTTTTATTTTTAGAAAATATATTATAGTTAATTCTGGTTATAGTAACCCTCTCCAAGGGAATTGG
ATAATTAAAGGTATTTTCGGGGAGATTATACTTAC

BLASTn

>MiV1ctg646

Length = 38071

Score = 412 bits (208), Expect = e-114

Identities = 208/208 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 59 gtggtaaagactgcaccaaagggctcgttacaaggggaattaaacgaaattatgaagttgag 118
|||||
Sbjct: 6713 gtggtaaagactgcaccaaagggctcgttacaaggggaattaaacgaaattatgaagttgag 6772

Query: 119 gatttggtgaaattgagaggatctattgatattgagtaaagaatagatatttttatttt 178
|||||
Sbjct: 6773 gatttggtgaaattgagaggatctattgatattgagtaaagaatagatatttttatttt 6832

Query: 179 agaaaatatattatagttaattctggttatagtaaccctctccaaggggaattggataatt 238
|||||
Sbjct: 6833 agaaaatatattatagttaattctggttatagtaaccctctccaaggggaattggataatt 6892

Query: 239 aaaggtatttcggggagattatacttac 266
|||||
Sbjct: 6893 aaaggtatttcggggagattatacttac 6920

Score = 67.9 bits (34), Expect = 8e-11

Identities = 34/34 (100%)

Strand = Plus / Plus

Score = 77.8 bits (39), Expect = 8e-14
Identities = 53/60 (88%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gcggttctatattaacaacnnnnnntgtcacagactatcgccaaaaatTTTTATCAAGT 60
|||||
Sbjct: 2636 gcggttctatattaacaacaaaaaatgtcacagactatcgccaaaaatTTTTATCAAGT 2695

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.28
Identities = 18/18 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 244 tatttcggggagattata 261
|||||
Sbjct: 2952 tatttcggggagattata 2969

BLASTx

gnl|MincDB|prot:Minc09712 length:457 contig:MiV1ctg348
region:2661-6616 strand:+
Length = 457

Score = 80.9 bits (198), Expect = 9e-17
Identities = 39/39 (100%), Positives = 39/39 (100%)
Frame = +2

Query: 26 MSQTIAKNFYQVVKTAPKGRYKGIKRNYEVEDLLKLRGS 142
MSQTIAKNFYQVVKTAPKGRYKGIKRNYEVEDLLKLRGS
Sbjct: 1 MSQTIAKNFYQVVKTAPKGRYKGIKRNYEVEDLLKLRGS 39

>gnl|MincDB|prot:Minc13172 length:963 contig:MiV1ctg646
region:6640-11731 strand:+
Length = 963

Score = 80.9 bits (198), Expect = 9e-17
Identities = 39/39 (100%), Positives = 39/39 (100%)

Frame = +2

Query: 26 MSQTIAKNFYQVVKTAPKGRYKGIKRNYEVEDLLKLRGS 142
MSQTIAKNFYQVVKTAPKGRYKGIKRNYEVEDLLKLRGS
Sbjct: 1 MSQTIAKNFYQVVKTAPKGRYKGIKRNYEVEDLLKLRGS 39

|||||
Sbjct: 4164 agtcttccgctggcggttcattcatcatccgtaactgcgttgatcctgagatgactcgcg 4105

Query: 468 gaacgaagatcactctttaccttaaagaggatcagactgactatttgaagagcgtcgta 527

|||||
Sbjct: 4104 gaacgaagataactctttaccttaaagaggatcagactgactatttgaagagcgtcgta 4045

Query: 528 ttcgtgaagtcgttaagaagcactcccaatttattggatatccgataaagctcttggttg 587

|||||
Sbjct: 4044 ttcgtgaagtggttaagaagcactctcaatttattggatatccgataaagctcttggttg 3985

Query: 588 agaaggaacgtgataaggaaatttctgatgatgaggctgaggat 631

|||||
Sbjct: 3984 agaaggaacgtgataaggagatttctgatgatgaggctgaggat 3941

Score = 464 bits (234), Expect = e-129

Identities = 246/250 (98%)

Strand = Plus / Minus

Query: 41 aaggaaattttccttcgtgaattgatctccaactcttctgacgctttggacaagattcgt 100

|||||
Sbjct: 4595 aaggaaattttccttcgtgaattgatctccaactcttctgatgctttggacaagattcgt 4536

Query: 101 tatcaagctttgactgatccagcccagttggagactggcaaggacctttacattaaaatt 160

|||||
Sbjct: 4535 tatcaagctttgactgatccagcccagttggagactggcaaggatctttacattaaaatt 4476

Query: 161 gtcccgaacaaggccgataagactttgactattatggatactggagtcggaatgactaag 220

|||||
Sbjct: 4475 gtcccgaacaaggccgataagactttgactattatggatactggagtcggaatgactaag 4416

Query: 221 gccgatcttgtaacaatcttggaactattgctaagtctggaactaaagctttcatggag 280
|
Sbjct: 4415 gccgatcttgtaacaatcttggaactattgctaaatctggaactaaggctttcatggag 4356

Query: 281 gctcttcagg 290
|
Sbjct: 4355 gctcttcagg 4346

Score = 79.8 bits (40), Expect = 6e-14
Identities = 43/44 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 ccagttgatgtccttgatcatcaacacggttctattccaacaagg 44
|
Sbjct: 4676 ccagttgatgtccttgatcatcaacacggttctattccaacaagg 4633

BLASTx

>gnl|MincDB|prot:Minc18114b length:299 contig:MiV1ctg1730
region:1950-4786 strand:-
Length = 299

Score = 394 bits (1012), Expect = e-110
Identities = 199/199 (100%), Positives = 199/199 (100%)
Frame = +2

Query: 2 QLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIRYQALTDPAQLETGKDLYIKIVPNKADK 181
QLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIRYQALTDPAQLETGKDLYIKIVPNKADK
Sbjct: 25 QLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNSSDALDKIRYQALTDPAQLETGKDLYIKIVPNKADK 84

Query: 182 TLTIMDTGVGMTKADLVNNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAFLVADR 361
TLTIMDTGVGMTKADLVNNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAFLVADR
Sbjct: 85 TLTIMDTGVGMTKADLVNNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAFLVADR 144

Query: 362 VTVTSKHNDDCHQWESSAGGSFIIRNCVDPEMTRGTKITLYLKEDQTDYLEERRIREVV 541

VTVTSKHND DDCHQWESSAGGSFIIRNCVDPEMTRGTKITLYLKEDQTDYLEERRIREVV
Sbjct: 145 VTVTSKHND DDCHQWESSAGGSFIIRNCVDPEMTRGTKITLYLKEDQTDYLEERRIREVV 204

Query: 542 KKHSQFIGYPIKLLVEKER 598

KKHSQFIGYPIKLLVEKER

Sbjct: 205 KKHSQFIGYPIKLLVEKER 223

>gnl|MincDB|prot:Minc18114a length:733 contig:MiV1ctg1730
region:1950-4786 strand:-
Length = 733

Score = 394 bits (1012), Expect = e-110
Identities = 199/199 (100%), Positives = 199/199 (100%)
Frame = +2

Query: 2 QLMSLIINTFY SNKEIFLRELISNSSDALDKIRYQALTDPAQLETGKDLYIKIVPNKADK 181

QLMSLIINTFY SNKEIFLRELISNSSDALDKIRYQALTDPAQLETGKDLYIKIVPNKADK

Sbjct: 25 QLMSLIINTFY SNKEIFLRELISNSSDALDKIRYQALTDPAQLETGKDLYIKIVPNKADK 84

Query: 182 TLTIMDTGVGMTKADLVN NLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAFLVADR 361

TLTIMDTGVGMTKADLVN NLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAFLVADR

Sbjct: 85 TLTIMDTGVGMTKADLVN NLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAFLVADR 144

Query: 362 VTVTSKHND DDCHQWESSAGGSFIIRNCVDPEMTRGTKITLYLKEDQTDYLEERRIREVV 541

VTVTSKHND DDCHQWESSAGGSFIIRNCVDPEMTRGTKITLYLKEDQTDYLEERRIREVV

Sbjct: 145 VTVTSKHND DDCHQWESSAGGSFIIRNCVDPEMTRGTKITLYLKEDQTDYLEERRIREVV 204

Query: 542 KKHSQFIGYPIKLLVEKER 598

KKHSQFIGYPIKLLVEKER

Sbjct: 205 KKHSQFIGYPIKLLVEKER 223

>Seqüência consenso 14-3-3 (MiV1ctg1197, MiV1ctg383, MiV1ctg2396)

CGTTATGATGACATGGCAGAGTCAATGAAGAAGGTTACCGAATTTGGAGACGAACTGTCTAATGAGGAGCGCAATCTTCTCTCGGTTGCTTATAAGAAATGTTGTTGGGGCTCGTCT
TTCTTCATGGCGTGTCTTCTTCGTCTATTGAGCAAAAGACCGAAGGGGGGAAGAAGACGATGACTAAGGAATACCGTGAGAAGATTGAATGTGAATTGCGTGACATTTGCAAAGGTG

TTATGAATCTTCTGGACAAATTTCTTATTCGAAAGCTGGAACCTCTGATTCTAAAGTGTTTTACCTTAAGATGAAGGGCGACTACTATCGTTATTTGGCTGAGGTTTCTTCTGGT
GATGAGTTGACTGATGTTATCGACAAATCACAACAGAGTTATCAAGAGGCTTTTCGATATTGCTAAGGACAAAATGCCGCCGACTCATCCAATTCGTCTTGGGCTGGCTCTCAACTT
TTCGGTCTTCTACTTTGAGATTCTCGACAATAAGGACAAGGCTTGTCTAGTTGGCTAAGCAGTCTTTTGATGAGGCCGTTGCTGAGTTGGACACTCTTGAAGAGAATTTGTACAAGG
ACTCGACTCTTATTATGCAACTT

BLASTn

>MiV1ctg1197

Length = 19649

Score = 297 bits (150), Expect = 1e-79
Identities = 153/154 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 84 ggttgcttataagaatggttggtgggctcgtcctttcttcatggcgtggttctttcgtctat 143
|||||
Sbjct: 9261 ggttgcttataagaatggttggtgggctcgtcgttcttcatggcgtggttctttcgtctat 9320

Query: 144 tgagcaaaagaccgaaggggggaagaagacgatgactaaggaataccgtgagaagattga 203
|||||
Sbjct: 9321 tgagcaaaagaccgaaggggggaagaagacgatgactaaggaataccgtgagaagattga 9380

Query: 204 atgtgaattgcgtgacatttgcaaaggtggtatg 237
|||||
Sbjct: 9381 atgtgaattgcgtgacatttgcaaaggtggtatg 9414

Score = 248 bits (125), Expect = 9e-65
Identities = 125/125 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 237 gaatcttctggacaaatttcttattccgaaagctggaactcctgattctaaagtgttta 296
|
Sbjct: 9746 gaatcttctggacaaatttcttattccgaaagctggaactcctgattctaaagtgttta 9805

Query: 297 ccttaagatgaagggcgactactatcgttatttggctgaggttcttctggtgatgagtt 356
|
Sbjct: 9806 ccttaagatgaagggcgactactatcgttatttggctgaggttcttctggtgatgagtt 9865

Query: 357 gactg 361
|
Sbjct: 9866 gactg 9870

Score = 244 bits (123), Expect = 1e-63
Identities = 123/123 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 403 gatattgctaaggacaaaatgccgccgactcatccaattcgtcttgggctggctctcaac 462
|
Sbjct: 10003 gatattgctaaggacaaaatgccgccgactcatccaattcgtcttgggctggctctcaac 10062

Query: 463 ttttcggtcttctactttgagattctcgacaataaggacaaggcttgtcagttggctaag 522
|
Sbjct: 10063 ttttcggtcttctactttgagattctcgacaataaggacaaggcttgtcagttggctaag 10122

Query: 523 cag 525
|
Sbjct: 10123 cag 10125

Score = 172 bits (87), Expect = 4e-42
Identities = 87/87 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 cgttatgatgacatggcagagtcaatgaagaaggttaccgaatttggagacgaactgtct 60
|||||
Sbjct: 9136 cgttatgatgacatggcagagtcaatgaagaaggttaccgaatttggagacgaactgtct 9195

Query: 61 aatgaggagcgcaatcttctctcggtt 87
|||||
Sbjct: 9196 aatgaggagcgcaatcttctctcggtt 9222

Score = 151 bits (76), Expect = 2e-35
Identities = 79/80 (98%)
Strand = Plus / Plus

Query: 524 agtcttttgatgaggccgcttgctgagttggacactcttgaagagaatttgtacaaggact 583
|||||
Sbjct: 10169 agtcttttgatgaggccgcttgctgagttggacactcttgaagagaatttgtacaaggact 10228

Query: 584 cgactcttattatgcaactt 603
|||||
Sbjct: 10229 cgactctcattatgcaactt 10248

Score = 85.7 bits (43), Expect = 8e-16
Identities = 43/43 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 361 gatgttatcgacaaatcacaacagagttatcaagaggctttcg 403
|||||
Sbjct: 9916 gatgttatcgacaaatcacaacagagttatcaagaggctttcg 9958

>MiV1ctg383
Length = 61090

Score = 281 bits (142), Expect = 7e-75

Identities = 151/154 (98%)
Strand = Plus / Minus

Query: 84 ggttgcttataagaatgttggttggggctcgtctttcttcatggcgtggttctttcgtctat 143
|||||
Sbjct: 24275 ggttgcttataagaatgttggttggggctcgtcgttcttcttggcgtggttctttcgtctat 24216

Query: 144 tgagcaaaagaccgaagggggaagaagacgatgactaaggaataccgtgagaagattga 203
|||||
Sbjct: 24215 tgagcaaaagaccgaaggtgggaagaagacgatgactaaggaataccgtgagaagattga 24156

Query: 204 atgtgaattgcgtgacatttgcaaaggtgttatg 237
|||||
Sbjct: 24155 atgtgaattgcgtgacatttgcaaaggtgttatg 24122

Score = 232 bits (117), Expect = 5e-60
Identities = 123/125 (98%)
Strand = Plus / Minus

Query: 237 gaatcttctggacaaatttcttattccgaaagctggaactcctgattctaaagtgttcta 296
|||||
Sbjct: 22993 gaatcttctggacaaatttcttattccgaaagctggaactcctgattctaaagtgttcta 22934

Query: 297 ccttaagatgaagggcgactactatcgttatttggctgaggtttcttctggtgatgagtt 356
|||||
Sbjct: 22933 ccttaagatgaaggtgactactatcgttatttggctgaggtttcttctggtgatgagtt 22874

Query: 357 gactg 361
||||
Sbjct: 22873 gactg 22869

Score = 220 bits (111), Expect = 2e-56
Identities = 120/123 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 403 gatattgctaaggacaaaatgccgccgactcatccaattcgtcttgggctggctctcaac 462
|||||
Sbjct: 22738 gatattgctaaggacaaaatgccgcccaactcatccaattcgtcttgggctggctctcaac 22679

Query: 463 ttttcggtcttctactttgagattctcgacaataaggacaaggcttgtcagttggctaag 522
|||||
Sbjct: 22678 ttttcggtcttctactttgagattctcgacaataagagcaaggcttgtcagttggctaag 22619

Query: 523 cag 525
|||
Sbjct: 22618 cag 22616

Score = 172 bits (87), Expect = 4e-42
Identities = 87/87 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cgttatgatgacatggcagagtcaatgaagaaggttaccgaatttggagacgaactgtct 60
|||||
Sbjct: 24400 cgttatgatgacatggcagagtcaatgaagaaggttaccgaatttggagacgaactgtct 24341

Query: 61 aatgaggagcgcaatcttctctcggtt 87
|||||
Sbjct: 24340 aatgaggagcgcaatcttctctcggtt 24314

Score = 143 bits (72), Expect = 4e-33
Identities = 78/80 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 524 agtcttttgatgaggccggttgctgagttggacactcttgaagagaatttgtacaaggact 583
|||||
Sbjct: 22572 agtcttttgatgaggccggttgctgagttggacactcttgacgagaatttgtacaaggact 22513

Query: 584 cgactcttattatgcaactt 603
|||||
Sbjct: 22512 cgactctcattatgcaactt 22493

Score = 77.8 bits (39), Expect = 2e-13
Identities = 42/43 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 361 gatgttatcgacaaatcacaacagagttatcaagaggctttcg 403
|||||
Sbjct: 22823 gatgttatcgacaaatcacaacagagttaccaagaggctttcg 22781

>MiV1ctg2396
Length = 5014

Score = 228 bits (115), Expect = 8e-59
Identities = 121/123 (98%)
Strand = Plus / Minus

Query: 403 gatattgctaaggacaaaatgccgccgactcatccaattcgtcttgggctggctctcaac 462
|||||
Sbjct: 3143 gatattgctaaggacaaaatgccccaactcatccaattcgtcttgggctcgctctcaac 3084

Query: 463 ttttcggtcttctactttgagattctcgacaataaggacaaggcttgtcagttggctaag 522
|||||
Sbjct: 3083 ttttcggtcttctactttgagattctcgacaataaggacaaggcttgtcagttggctaag 3024

Query: 523 cag 525
|||
Sbjct: 3023 cag 3021

Score = 224 bits (113), Expect = 1e-57
Identities = 122/125 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 237 gaatccttctggacaaatcttattccgaaagctggaactcctgattctaaagtgttta 296
||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct: 3400 gaatccttctgacaaatcttattccgaaagctggaactcctgattctaaagtgttcta 3341

Query: 297 ccttaagatgaagggcgactactatcggtattttggctgaggtttcttctggtgatgagtt 356
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct: 3340 ccttaagatgaagggcgactactatcggtatctggctgaggtttcttctggtgatgagtt 3281

Query: 357 gactg 361
|||||
Sbjct: 3280 gactg 3276

Score = 172 bits (87), Expect = 4e-42
Identities = 123/135 (91%)
Strand = Plus / Minus

Query: 84 ggttgcttataagaatggtggtgggctcgtctttcttcatggcgtggtctttcgtctat 143
||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||| |||||||||
Sbjct: 3796 ggttgcttataagaatggtggtgggctcgtcgttcttcttggcgtgctctttcgtctat 3737

Query: 144 tgagcaaaagaccgaagggggaagaagacgatgactaaggaataccgtgagaagattga 203
||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||| ||||||||| ||
Sbjct: 3736 tgagcaaaaggccgaaggggagaagaagacgaagactaaggatcgtgagaagatcga 3677

Query: 204 atgtgaattgcgtga 218
| |||||
Sbjct: 3676 gggcgaattgcgtga 3662

Score = 157 bits (79), Expect = 3e-37
Identities = 85/87 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cgttatgatgacatggcagagtcaatgaagaaggttaccgaatttgagacgaactgtct 60
|||||
Sbjct: 3921 cgttatgatgacatggcagaggcaatgaagaaggttaccgaatttgagacgaactgtct 3862

Query: 61 aatgaggagcgcaatcttctctcggtt 87
|| |||||
Sbjct: 3861 aacgaggagcgcaatcttctctcggtt 3835

Score = 135 bits (68), Expect = 9e-31
Identities = 77/80 (96%)
Strand = Plus / Minus

Query: 524 agtcttttgatgaggccggttgctgagttggacactcttgaagagaatttgtagaaggact 583
|||||
Sbjct: 2976 agtcttttgatgaggctggttgctgagttggacactcttgacgagaatttgtagaaggact 2917

Query: 584 cgactcttattatgcaactt 603
|||||
Sbjct: 2916 cgactctcattatgcaactt 2897

Score = 77.8 bits (39), Expect = 2e-13
Identities = 42/43 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 361 gatgttatcgacaaatcacaacagagttatcaagaggctttcg 403
|||||
Sbjct: 3230 gatgttatcgacaaatcacaacagagttaccaagaggctttcg 3188

BLATx

>gnl|MincDB|prot:Minc16550 length:300 contig:MiV1ctg1197
region:7793-10508 strand:+
Length = 300

Score = 398 bits (1022), Expect = e-112
Identities = 200/201 (99%), Positives = 200/201 (99%)
Frame = +1

Query: 1 RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARLSSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT 180
RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGAR SSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT
Sbjct: 70 RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT 129

Query: 181 KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVFYLMKMGDYYRYLAEVSSGDEL 360
KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVFYLMKMGDYYRYLAEVSSGDEL
Sbjct: 130 KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVFYLMKMGDYYRYLAEVSSGDEL 189

Query: 361 DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVIFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA 540
DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVIFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA
Sbjct: 190 DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVIFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA 249

Query: 541 VAELDTLEENLYKDSTLIMQL 603
VAELDTLEENLYKDSTLIMQL
Sbjct: 250 VAELDTLEENLYKDSTLIMQL 270

>gnl|MincDB|prot:Minc10258 length:400 contig:MiV1ctg383
region:22238-27670 strand:-
Length = 400

Score = 394 bits (1013), Expect = e-111
Identities = 198/201 (98%), Positives = 199/201 (99%)

Frame = +1

Query: 1 RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARLSSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT 180
RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGAR SSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT
Sbjct: 170 RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT 229

Query: 181 KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVIFYLKMKGDYRYLAEVSSGDELT 360
KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVIFYLKMKGDYRYLAEVSSGDELT
Sbjct: 230 KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVIFYLKMKGDYRYLAEVSSGDELT 289

Query: 361 DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA 540
DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVFYFEILDNK KACQLAKQSFDEA
Sbjct: 290 DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVFYFEILDNKSACQLAKQSFDEA 349

Query: 541 VAELDTLEENLYKDSTLIMQL 603
VAELDTL+ENLYKDSTLIMQL
Sbjct: 350 VAELDTLDENLYKDSTLIMQL 370

>gnl|MincDB|prot:Minc18869 length:261 contig:MiV1ctg2396
region:2665-4042 strand:-
Length = 261

Score = 376 bits (965), Expect = e-105
Identities = 191/201 (95%), Positives = 194/201 (96%)
Frame = +1

Query: 1 RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARLSSWRVLSSIEQKTEGGKKTMT 180
RYDDMAE+MKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGAR SSWRVLSSIEQK EG KKT T
Sbjct: 31 RYDDMAEAMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVLSSIEQKAEGEKKTKT 90

Query: 181 KEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVIFYLKMKGDYRYLAEVSSGDELT 360
K YREKIE ELRDI KGV+NLLDKFLIPKAGTPDSKVIFYLKMKGDYRYLAEVSSGDELT
Sbjct: 91 KGYREKIEGELRDISKGVNLLDKFLIPKAGTPDSKVIFYLKMKGDYRYLAEVSSGDELT 150

Query: 361 DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA 540
DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA
Sbjct: 151 DVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVFYFEILDNKDKACQLAKQSFDEA 210

Query: 541 VAELDTLEENLYKDSTLIMQL 603
VAELDTL+ENLYKDSTLIMQL
Sbjct: 211 VAELDTLDENLYKDSTLIMQL 231

>gnl|MincDB|prot:Minc07565 length:252 contig:MiV1ctg229
region:21142-22829 strand:+
Length = 252

Score = 324 bits (830), Expect = 2e-89
Identities = 164/204 (80%), Positives = 184/204 (90%), Gaps = 3/204 (1%)
Frame = +1

Query: 1 RYDDMAESMKKVTEFGDELSNEERNLLSVAYKNVVGARLSSWRVLSSIEQKTEGGKKT-- 174
RYDDMA+SMKKVTE G ELSNEERNLLSVAYKNVVGAR SSWRV+SSIEQKTEG +K
Sbjct: 20 RYDDMAQSMKKVTELGAEELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTEGSEKKQQ 79

Query: 175 MTKEYREKIECELRDICKGVMNLLDKFLIPKAGTPDSKVFYLMKMGDYRYLAEV-SSGD 351
M KEYREK+E ELRDIC V++LLDK+LIPKAG P+SKVFYLMKMGDYRYLAEV ++GD
Sbjct: 80 MAKEYREKVERELRDICHVDLDDLLDKYLIPKAGNPESKVFYLMKMGDYRYLAEVVATGD 139

Query: 352 ELTDVIDKSQQSYQEAFDIAKDKMPPTHPIRLGLALNFSVIFYEILDNKDKACQLAKQSF 531
+ V++KSQQSYQEAFDIAKDKM PTHPIRLGLALNFSVIFY+EIL++ DKACQLAKQ+F
Sbjct: 140 DRNSVVEKSQQSYQEAFDIAKDKMQPTHPIRLGLALNFSVIFYEILNSPDKACQLAKQAF 199

Query: 532 DEAVAELDTLEENLYKDSTLIMQL 603
D+A+AELDTL E+ YKDSTLIMQL
Sbjct: 200 DDAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQL 223

>gnl|MincDB|prot:Minc09397 length:437 contig:MiV1ctg330
region:9747-12002 strand:+
Length = 437

Score = 149 bits (377), Expect = 5e-37
Identities = 74/94 (78%), Positives = 86/94 (91%), Gaps = 1/94 (1%)
Frame = +1

Query: 325 YLAEV-SSGDELTDVIDKSQQSYQEAFDIADKMPPTHPIRLGLALNFSVIFYFEILDNKD 501
YLAEV ++GD+ V++KSQQSYQEAFDIADKMPPTHPIRLGLALNFSVIFY+EIL++ D
Sbjct: 315 YLAEVVATGDDRNSVVEKSQQSYQEAFDIADKMPPTHPIRLGLALNFSVIFYEILNSPD 374

Query: 502 KACQLAKQSFDEAVAELDTLEENLYKDSTLIMQL 603
KACQLAKQ+FD+A+AELDTL E+ YKDSTLIMQL
Sbjct: 375 KACQLAKQAFDDAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQL 408

Artigo Primeira autoria

Knock down of genes Isocitrate Lyase and HSP90 reduces phytonematode reproduction in *Nicotiana tabacum*.

Isabela Tristan Lourenço, Rodrigo da Rocha Fragoso, Jose Dijair A. de Souza Jr, Antônio Américo Barbosa Viana, Diogo Martins de Sá, Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Janice de Almeida-Engler, Maria Fatima Grossi de Sá. BMC Biotechnology. Em preparação.

Artigos publicados – Co-autoria

Knocking-down *M.incognita* proteinases by plant delivered dsRNA affect nematode size, egg viability and progeny virulence.

Jose Dijair A. de Souza Jr, Roberta Ramos Coelho, Isabela Tristan Lourenço, Rodrigo da Rocha Fragoso, Antonio Americo Barbosa Viana, Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro, Gilbert Engler, Janice de Almeida-Engler, Maria Fatima Grossi de Sá. PloSOne

Artigos em elaboração – Co-autoria

Isolation and functional characterization of a soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene promoter responsive to biotic stresses.

Rodrigo Rocha Fragoso; Antônio Américo Barbosa Viana; Vívian de Jesus Miranda; Isabela Tristan Lourenço; Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro; João Aguiar Nogueira Batista; Janice de Almeida Engler; Gilbert Engler; Maria Fátima Grossi de Sa. BMC Biotechnology. Em preparação.

Reference genes for gene expression analisys of different developmental stages of sugarcane giant borer.

Fonseca, F.C.A; Redorat, F.S; Lourenço, I.T; Firmino, A.A.P.; Macedo, L.L.P.; Grossi-de-Sá, M.F. BMC Biotechnology. Em preparação.

Cry proteins highly toxic to sugarcane giant borer.

Fonseca, F.C.A ; Leonardo L. P. Macedo; Souza Jr, J.D.A.; Redorat, F.S;
Lourenço, I.T; Grossi-de-Sá, M.F. *Pest Management Science*. Em preparação.

Patentes depositadas

SA, M.F.G.; ROMANO, E.; FRAGOSO, R.R; FERREIRA, A.; LOURENÇO, I.T.; MATTAR, M.C. "CASSETE DE EXPRESSÃO PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS ESPÉCIES DE NEMATOIDES EM PLANTAS, MÉTODOS E PLANTAS QUE O UTILIZAM".2013,Brasil. Número do registro: 0000921304245070, data de depósito: 11/06/2013, título: "CASSETE DE EXPRESSÃO PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS ESPÉCIES DE NEMATOIDES EM PLANTAS, MÉTODOS E PLANTAS QUE O UTILIZAM". Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

SA, M. F. G. ; FONSECA, F. C. A. ; LOURENÇO, I. T. ; SA, M. F. G. ; Silva, M.C.M. ; LUCENA, W. ; GOMES-JUNIOR, J. E. ; MACEDO, L. L. P. MOLÉCULAS VARIANTES SINTÉTICAS DE TOXINAS CRY11A12 COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS. 2012, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: PI1020120335425, data de depósito: 28/12/2012, título: "MOLÉCULAS VARIANTES SINTÉTICAS DE TOXINAS CRY11A12 COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS". Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

SA, M. F. G. ; FIRMINO, A. A. P. ; MACEDO, L. L. P. ; COELHO, R. R. ; SA, M. F. G. ; Silva, M.C.M. ; LOURENÇO, I. T. . MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DE QUITINA SINTASES. 2012, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: PI1020120335395, data de depósito: 28/12/2012, título: " MÉTODO

E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DE QUITINA SINTASES". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

SA, M. F. G. ; FIRMINO, A. A. P. ; Martins de Sá, D ; LOURENÇO, I. T.; MACEDO, L. L. P. ; Silva, M.C.M. ; SA, M. F. G. ; COELHO, R. R. . 'MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM

PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DE LACASES. 2012, Brasil.

Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: PI1020120335069, data de depósito: 28/12/2012, título: "'MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DE LACASES" . Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.