



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAFAEL BRUNO GUAYATO NOMURA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO  
FUNCIONAL DE GENES EM *Pratylenchus brachyurus* E  
CARACTERIZAÇÃO DA PROTEINA PB6584.1 ENVOLVIDA  
NO PARASITISMO**

---

Londrina  
2017

RAFAEL BRUNO GUAYATO NOMURA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO  
FUNCIONAL DE GENES EM *Pratylenchus brachyurus* E  
CARACTERIZAÇÃO DA PROTEINA PB6584.1 ENVOLVIDA  
NO PARASITISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra Francismar Correa Marcelino-Guimarães.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nomura, Rafael Bruno Guayato.

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO FUNCIONAL DE GENES EM *Pratylenchus brachyurus* E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEINA PB6584.1 ENVOLVIDA NO PARASITISMO / Rafael Bruno Guayato Nomura. - Londrina, 2017. 91 f.

Orientador: Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Fitonematoides - Tese. 2. RNA de interferência - Tese. 3. Genômica funcional - Tese. 4. Silenciamento gênico - Tese. I. Marcelino-Guimarães, Francismar Corrêa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

RAFAEL BRUNO GUAYATO NOMURA

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO FUNCIONAL  
DE GENES EM *Pratylenchus brachyurus* E CARACTERIZAÇÃO DA  
PROTEINA PB6584.1 ENVOLVIDA NO PARASITISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Francismar Corrêa  
Marcelino-Guimarães  
Embrapa Soja/ UEL

---

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dra. Luana Mieko Darben  
Embrapa Soja

Londrina, 30 de Março de 2017.

*Instrui ao menino no caminho em que deve andar;  
e até quando envelhecer não se desviará dele.*

*Provérbios (22:6)*

*À minha mãe Marli, e minha avó Dirce,  
por todo o amor, incentivo e suporte,  
sem os quais nada seria possível.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por me conduzir até aqui, sempre me dando força para superar todas as barreiras.

Agradeço a minha mãe Marli e minha avó Dirce, pois sem elas nada seria possível, sendo o meu alicerce em todos os momentos.

Aos meus irmãos Letícia e Rodrigo, meus tios Márcia e Fábio e minha prima Laís, por estarem sempre ao meu lado.

À minha orientadora Dra. Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães, por ter me recebido de braços abertos, pela paciência e por todo o suporte e orientação oferecidos na condução dos trabalhos.

À Valéria Caitar e Suellen Hishinuma, não somente pelo auxílio e orientação desde o início do trabalho, mas também pelo grande carinho, amizade, paciência e disposição.

A equipe do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja: César A. Silveira, Márcia Kamogae Kuwahara Silvana Rothenbach Marin e Vera Pierotte, por toda a estrutura e ensinamentos, essenciais a conclusão deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja Alessandra Yokoyama, Ariane Lopes, Bianca Guimarães, Bruna Caroline Sercero, Jean Carlos, Joan Fernandes, Kenia Carvalho, Luana Darben, Luciano Aoyagi, Michele Rincão e Talitta Parmezan.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja Dra. Ivani Negrão Lopes e Dr. Waldir Pereira Dias, pela ajuda no decorrer dos trabalhos.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial aos docentes do programa de pós-graduação em Biotecnologia: Dr. André Luíz Martinez de Oliveira, Dra. Daniele Sartori, Dr. Doumit Camilios, Dra. Elisabete Ono, Dra. Josiane Vignoli, Dra.

Mariângela Hungria, Dra. Maria Antonia Celligoi, Dra. Maria Inês Rezende e Dra. Suzana Mali de Oliveira, pelo conhecimento e paciência.

À Embrapa Soja por fornecer toda a estrutura necessária à condução do trabalho.

À toda equipe do setor de nematologia da Embrapa Soja, por fornecerem a ajuda e materiais necessários para a realização dos experimentos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Diva Souza Andrade, pelo apoio desde o início da graduação.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para que esta etapa pudesse ser concretizada.

Todo o meu carinho e agradecimento!

NOMURA, Rafael Bruno Guayato. **Padronização de Metodologias para o Estudo Funcional de Genes em *Pratylenchus brachyurus* e Caracterização da Proteína PB6584.1 Envolvida no Parasitismo**. 2017. 92p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

## RESUMO

*Pratylenchus brachyurus* é atualmente o segundo principal fitonematoide na cultura da soja no Brasil. Considerando que as atuais práticas agronômicas para o controle deste patógeno não tem alcançado êxito, o desenvolvimento de variedades resistentes se apresenta uma alternativa promissora. Atualmente, a metodologia de RNA interferente (RNAi) constitui uma importante ferramenta para o estudo funcional de genes em diferentes espécies. De maneira geral, estudos de RNAi em fitonematoides são conduzidos tanto *in vitro*, via soaking, como *in vivo*, através de plantas geneticamente modificadas para expressarem moléculas de RNA dupla fita (dsRNA). Recentemente, a administração das moléculas de dsRNA *in planta*, sem a necessidade de transformação genética, vem sendo testada em vários patossistemas. Esta é conhecida como Aplicação Ectópica (AE), e se baseia na absorção direta do dsRNA pela planta. Embora seu uso em estudos envolvendo fitonematoides ainda não tenha sido descrito, os resultados em insetos evidenciam seu potencial para utilização em outros organismos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de utilização dessas metodologias (Soaking e AE) para o estudo de genes em *P. brachyurus*, em especial da proteína PB6584.1, potencialmente envolvida no estabelecimento da parasitismo. Inicialmente, o método de soaking foi avaliado, sendo utilizadas moléculas de dsRNA não complementares aos transcritos do nematoide como controle para os testes. A capacidade de ingestão das moléculas de dsRNA foi determinada pela incubação dos nematoides em solução contendo dsRNA, octopamina (neuroestimulante) e marcadores de ingestão (FITC e dsRNA ligado ao fluorocromo Cy-3). Após a incubação, foram observados sinais de fluorescência no estilete e glândula esofágica, indicando que os nematoides foram capazes de ingerir o dsRNA. Para a avaliação da metodologia de AE, foi realizada a absorção radicular de dsRNA-GFP em plantas de soja. Foram avaliados o transporte do dsRNA através do tecido vegetal, bem como sua estabilidade ao longo do tempo, sendo o dsRNA detectado após 60 dias da infecção. Esses resultados demonstram o potencial dessas metodologias para o estudo de genes nesse nematoide. Para a caracterização da proteína PB6584.1, foi avaliado o perfil de expressão do gene ao longo do ciclo infeccioso, indicando a ativação da transcrição do candidato já no tempo de 12h após a infecção. Adicionalmente, o efeito do silenciamento do gene foi avaliado por ambas as metodologias, medindo-se a capacidade de multiplicação dos nematoides em cilindros de cenoura, após o soaking, e em plantas de soja, via soaking e AE das moléculas de dsRNA no solo. Após 60 dias, foi avaliado o fator de reprodução (FR) de cada planta, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos (controle e PB6584.1). As análises de expressão do gene candidato demonstraram a ocorrência de silenciamento gênico em ambos os métodos. Assim, mais estudos se fazem necessários visando o estabelecimento de um método baseado em RNAi, para o estudo funcional de genes em *P. brachyurus*.

**Palavras-chave:** RNAi. Aplicação Ectópica. Soaking. Soja.

NOMURA, Rafael Bruno Guayato. **Standardization of Methods for Gene Function Studies in *Pratylenchus brachyurus* e Characterization of PB6584.1 protein involved on parasitism**. 2017. 92p. Dissertation (Master degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

## ABSTRACT

*Pratylenchus brachyurus* is the second most important plant-parasitic nematode in soybean crops in Brazil. As the current agronomic practices to control this pathogen have been shown unsuccessful and not worth, the development of resistant varieties is a promising alternative. Nowadays, the RNA interference mechanism constitutes an important tool for gene function studies among different species. Traditionally, RNAi-based studies in PPNs are performed by both, *in vitro*, by soaking and *in planta*, by genetic modified plants expressing dsRNA molecules approaches. Recently, non-transgenic dsRNA delivery, *in planta*, has been applied for many different plant pathogen and pests. Known as Ectopic Delivery (ED) of dsRNA molecules, The methodology is based on the root absorption of the dsRNA and no data about its application in PPNs studies is available. Studies involving ED in insects shows that they were able to uptake the root absorbed dsRNA by feeding and have their target gene silenced. It makes clear the potential of the method for application in other organisms. The aim of this study was to evaluate the potential of this non-transgenic methods (Soaking and ED) for gene function studies in *P. brachyurus*, specially in PB6584.1 protein, potentially envolved in its parasitism. Initially soaking was performed using non-target dsRNA-GFP. The nematode's ingestion ability was evaluated through *P. brachyurus* mixed stages incubation in a soaking solution in the presence of dsRNA, neurostimulant octopamine and fluorescent ingestion markers (FITC and Cy -3 labeled dsRNA). After incubation, fluorescence was observed in both stylet and esophageal glands, indicating that the soaked nematodes ingested the dsRNA. For *in planta* ectopic delivery, dsRNA root absorption was performed in soybean plants. We evaluated the transport of dsRNA through the plant tissues as well as its stability over the time being detected even after 60 days. These results demonstrate the potential of both methods for gene function studies in this nematode specie. For the PB6584.1 protein characterization, its expression profile during the infection cycle was evaluated indicating the protein transcription activation on 12h after infection. Additionally, the effect of its silencing was evaluated for both methods, measuring the nematode's multiplication capacity on carrot cylinders, after soaking, and on soybean plants, after soaking and dsRNA ED. After 60dpi, reproduction factor was measured in each plant, where no significant difference was observed between the treatments (control and PB6584.1). Also, the PB6584.1 expression was measured, demonstrating the occurrence of specific gene silencing in both methods. Thus, more studies are required for the stablishment of a RNAi-based method for gene funcion studies in *P. brachyurus*.

**Palavras-chave:** RNAi. Ectopic delivery. Soaking. Soybean.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Ciclo biológico do nematoide *P. brachyurus*. .....20
- Figura 2** – Sintomas causados por *P. brachyurus* nas raízes da soja: planta sadia (a) e parasitada (b). .....21
- Figura 3** – Via de geração de siRNAs e silenciamento gênico em *C. elegans*.... 28
- Figura 4** – Amplificação do sinal de siRNA pela enzima RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP) .....29
- Figura 5** – Cilindros de cenoura esterilizadas .....44
- Figura 6** – Microscopia de fluorescência de juvenil (J2) de *P. brachyurus* em solução de soaking + dsRNA-GFP (2mg/mL) após 16h de incubação. A, B, F e G: C/ acréscimo de FITC (1mg/mL). C e H: Sem FITC. D, E, I e J: dsRNA marcado com Cy3 .....48
- Figura 7** – Amplificação do fragmento correspondente ao dsRNA de GFP no tecido dos nematoides tratados em solução de soaking. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da reação de PCR (primers F2/R2) (Amplicon de 206pb). 1, 2 e 3: RNA dos nematoides; 4: Controle positivo; 5: Marcador de peso molecular 1Kb plus; e 6: Controle negativo .....49
- Figura 8** – Detecção e estabilidade de dsRNA-GFP nos tecidos foliar e radicular de soja. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da reação de PCR (primers F2/R2). (A) Amostras de RNA do tecido foliar. 1: Ladder 1Kb; 2, 3 e 4: 12hai; 5, 6 e 7: 48hpi; 8, 9 e 10: 96hai; 11, 12 e 13: 60dai. 14: cDNA de soja; 15: cDNA de *P. brachyurus*; 16: Controle positivo; 17: Ladder 1Kb; 18 Controle negativo. (B) Amostras de RNA do tecido radicular. 1: Ladder 1Kb; 2, 3 e 4: 12hpi; 5, 6 e 7: 48hpi; 8, 9 e 10: 96hpi; 11, 12: 60dai. 13: cDNA de soja; 14: cDNA de *P. brachyurus*; 15: Controle positivo; 16: Ladder 1Kb; 17 Controle negativo ..... 50
- Figura 9** – Sintomas indicativos do estabelecimento e multiplicação de *P. brachyurus* nos cilindros de cenoura, com lesão inicial sobre o ponto de inoculação, visualizado após aproximadamente 60 daí .....53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Relação de genes de fitonematoides efetivamente silenciados por RNAi .....	31
<b>Tabela 2</b> –	Sequências das moléculas de dsRNA utilizadas .....	37
<b>Tabela 3</b> –	Iniciadores utilizados para análises por RT-qPCR .....	43
<b>Tabela 4</b> –	Valores de nematoides por planta, fator de reprodução e nível de expressão do gene PB6584.1 60dai .....	60

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Perfil de expressão do candidato PB6584.1 ao longo do ciclo infeccioso, utilizando os valores de média de  $\Delta Ct$  ..... 52
- Gráfico 2** – Resultado da contagem do número de indivíduos de *P. brachyurus* tratados com dsRNA para o silenciamento do gene PB6584.1 em cilindros de cenoura. (A) Número médio de nematoides por cilindro; (B) Número médio de nematoides por grama de tecido ..... 54
- Gráfico 3** – Resultado da contagem do número médio de indivíduos de *P. brachyurus* tratados com dsRNA para o silenciamento do gene PB6584.1 em plantas de soja. Método de entrega: (A) Soaking; (B) Aplicação ectópica ..... 55
- Gráfico 4** – Valores de percentagem (%) de silenciamento médio, resultantes da análise de expressão relativa por RT-qPCR do gene candidato PB6584.1 após 60dai. (S) Soaking; (AE) Aplicação ectópica. .... 56
- Gráfico 5** – Valores de percentagem (%) de silenciamento resultantes da análise de expressão relativa por RT-qPCR do gene candidato PB6584.1 após 60dai. (S) Soaking; (AE) Aplicação ectópica. .... 57

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1	SOJA: ASPECTOS GERAIS E ECONÔMICOS .....	15
2.2	NEMATOIDES NA CULTURA DA SOJA .....	17
2.2.1	<i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	18
2.3	EFETORES DO PARASITISMO DE FITONEMATOIDES .....	22
2.3.1	Família 14-3-3 .....	25
2.4	RNA INTERFERENTE COMO FERRAMENTA PARA VALIDAÇÃO FUNCIONAL DE GENES .....	26
3	OBJETIVO GERAL .....	35
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1	SELEÇÃO DO GENE CANDIDATO .....	36
4.2	PREPARO DO INÓCULO .....	36
4.3	PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO FUNCIONAL DE GENES DE <i>P. BRACHYURUS</i> VIA PTGS.....	37
4.3.1	Obtenção do dsRNA .....	37
4.3.2	Ensaio de Fornecimento de dsRNA via “Soaking” .....	38
4.3.3	Ensaio de fornecimento de dsRNA via Aplicação Ectópica na Raíz .....	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CANDIDATO A EFETOR DE <i>P.</i> <i>BRACHYURUS</i> .....	40
4.4.1	Perfil de Expressão ao Longo do Ciclo Infeccioso .....	40
4.4.2	Silenciamento gênico do candidato a efetor via Soaking .....	43
4.4.3	Silenciamento gênico do candidato a efetor via Aplicação Ectópica na Raíz .....	45
4.4.4	Análise estatística.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1	PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO FUNCIONAL DE GENES DE <i>P. BRACHYURUS</i> VIA PTGS.....	47
5.1.1	Ensaio de Fornecimento de dsRNA via Soaking .....	47
5.1.2.	Ensaio de fornecimento de dsRNA via Aplicação Ectópica na Raíz.....	49
5.2	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE CANDIDATO A EFETOR DE <i>P. BRACHYURUS</i> PB6584.1 .....	52
5.2.1.	A ativação do gene PB6584.1 ocorre quando em primeiro contato com a planta .....	52
5.2.2.	Silenciamento do gene PB6584.1 em Cilindros de Cenoura .....	53
5.2.3	Silenciamento do gene PB6584.1 em plantas de Soja infectadas .....	55
6	CONCLUSÕES .....	61
7	ARTIGO: RNA INTERFERENTE COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO FUNCIONAL DE GENES NO NEMATOIDE CAUSADOR DE LESÕES RADICULARES <i>PRATYLENCHUS BRACHYURUS</i> .....	62
8	REFERÊNCIAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

*Pratylenchus brachyurus* é um endoparasita migrador, com ampla distribuição geográfica (SILVA *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007; UEBEL *et al.*, 2014), onde machos e fêmeas são capazes de penetrar o hospedeiro através ou entre as células do parênquima cortical do tecido radicular. No parênquima, esses organismos alimentam-se do conteúdo celular, provocando lesões, desorganizando e destruindo as células no local de sua penetração e movimentação (FONSECA, 2012), e, dessa forma, tornando a planta predisposta a infecções secundárias de fungos e bactérias (GOULART, 2008).

Por se tratar de um patógeno biotrófico, o êxito de seu parasitismo é dependente de sua capacidade em estabelecer uma relação com o hospedeiro, que permita a conclusão de seu ciclo de vida sem que ocorra a morte do tecido vegetal (SANTINI, 2014). Para isso, os nematoides secretam proteínas e outras moléculas, denominadas efetores de parasitismo, que interagem diretamente com as moléculas do hospedeiro. A atividade desses efetores, aliada a ação mecânica do estilete, melhoram o seu potencial de colonização, sobrevivência e reprodução no tecido radicular da planta, através de modificações na estrutura e funções da célula do hospedeiro (HOGENHOUT *et al.*, 2009), ou mesmo interferindo na resposta de defesa da planta (FERNANDES, 2011).

A interação de *P. brachyurus* com a soja pode ser considerada menos complexa, por não haver a necessidade de formação de nenhuma célula especializada de alimentação, como ocorre em outras espécies de fitonematoides (DIAS *et al.*, 2010a). Esse fato dificulta a seu controle (LOURENÇO, 2014), e torna-se clara a necessidade de se buscar genótipos resistentes a esse parasita. Até o momento, poucos genótipos de soja têm sido identificados como apresentando resistência efetiva à infecção por *P. brachyurus*, sendo que nenhum gene de resistência foi descrito ou mapeado. Adicionalmente, o emprego de estratégias biotecnológicas, visando a indução de resistência a genótipos, constitui uma alternativa promissora e de grande importância, principalmente utilizando métodos relacionados ao silenciamento de genes do patógeno via estratégias de RNAi (KATOCH e THAKUR, 2013; DUTTA, BANAKAR e RAO, 2015).

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja – Londrina, Paraná, vem realizando pesquisas buscando o entendimento da interação

planta-nematoide, visando o controle desta praga. Entre essas pesquisas, encontra-se o screening de genótipos de soja, visando a busca de fontes de resistência, bem como a caracterização de proteínas do patógeno potencialmente envolvidas no parasitismo de *P. brachyurus*. Tais proteínas foram previamente identificadas *in silico*, a partir do sequenciamento de raízes infectadas com o nematoide, e tiveram expressão localizada na glândula secretora do patógeno, um importante indicativo de seu envolvimento no parasitismo (dados não publicados). Este trabalho se propôs em estabelecer uma metodologia para estudo funcional de genes de *P. brachyurus* via silenciamento gênico pós transcricional, visando validar tais candidatos a efetores e demonstrar sua importância no processo infeccioso desse importante patógeno em soja. No presente trabalho, foram testadas duas metodologias que empregam moléculas de dsRNA como indutoras da maquinaria de silenciamento gênico, e que se apresentam como alternativas às metodologias de validação funcional que necessitam de transformação genética. A metodologia de aplicação ectópica de dsRNA nas raízes de soja foi avaliada comparativamente com testes via soaking, comumente utilizada para ensaios de silenciamento gênico em nematoides.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SOJA: ASPECTOS GERAIS E ECONÔMICOS

A soja é uma planta pertencente ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, à classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae* (antiga *Leguminosae*), subfamília *Faboideae* (*Papilionoideae*), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill (SEDIYAMA, TEIXEIRA e BARROS, 2009). É classificada como planta anual, de porte ereto, ramificada esparsamente, com um tipo de crescimento arbustivo e com folhas trifoliadas alternadas, com folíolos ovalados, ovais a lanceolados-elípticos. Suas flores são brancas ou roxas podendo haver diferenças de tonalidades. As vagens são retas ou ligeiramente curvadas, contendo uma a quatro sementes de forma ovalada ou sub-esférica, as cores do tegumento podem variar de amarelo-claro, verde-oliva ou marrom a preto avermelhado (SEDIYAMA, TEIXEIRA e REIS, 2005).

Trata-se de uma leguminosa de ciclo anual (90 a 160 dias), originária do Extremo Oriente, cultivada na China há milhares de anos (CAVALETT, 2008), com as primeiras citações datadas do período entre 2.883 e 2.838 a. C. (FINHOLDT, 2012). Os registros apontam que a soja tenha sido introduzida no Brasil via Estados Unidos (FINHOLDT, 2012), especificamente no estado da Bahia em 1882 e levada para São Paulo em 1892 (ALAMBERT, 2010). Essa leguminosa foi cultivada pela primeira vez em escala comercial no Rio Grande do Sul em 1900 e em 1936 ocorre o início da expansão desta cultura no estado (COSTA, 1996; MATSUO, 2012). Entretanto, foi apenas na década de 1970 que o Brasil foi elevado a condição de um dos maiores produtores e exportadores mundiais (GOMES, 2001).

A nível mundial, a soja é a principal oleaginosa produzida e consumida (CAVALETT, 2008), sendo os Estados Unidos o principal produtor, seguido por Brasil e Argentina, que juntos, são responsáveis por aproximadamente 80% de toda a produção mundial (USDA, 2016). Somente no Brasil, é estimada para a safra 2016/2017, uma produção de 103,8 milhões de toneladas de soja, o que representa 48,2% de toda a produção brasileira de grãos (CONAB, 2017).

Essa estimativa, quando comparada com a safra de 1977/78, com uma produção inferior a 9,8 milhões de toneladas, torna evidente o grande crescimento em sua produção. Essa aumento na produção é uma consequência da

grande demanda por essa *commodity*, resultado de sua grande importância econômica mundial (BRASIL, 2012), pois dá origem a subprodutos de grande importância. O farelo, amplamente utilizado como ração animal, constitui uma boa fonte de proteínas de baixo custo (CAVALETT, 2008; ALAMBERT, 2010). Já o óleo, pode ser utilizado tanto para consumo humano, como matéria-prima para a fabricação de alimentos, como na indústria de biocombustíveis (DE OLIVEIRA e DOS REYS, 2009).

Esse crescimento foi possível graças ao aumento da área destinada ao cultivo, aliada a melhorias nas tecnologias e condições de cultivo (CAVALETT, 2008; FREITAS, 2011; LOPES, 2012), além do desenvolvimento de variedades geneticamente adaptadas às diferentes condições de clima, solo e latitude, possibilitando o cultivo desta leguminosa em todas as regiões do país (ALAMBERT, 2010; FREITAS, 2011).

Além disso, a soja também apresenta grande importância socioeconômica para o Brasil, pois movimenta diversos setores, tais como: indústrias de máquinas e equipamento, cooperativas agropecuárias e agroindustriais, indústria de alimentos, dentre outras (EMBRAPA, 2014). Tudo isso gera mais de 5 milhões de empregos, diretos e indiretos, com participação significativa nos 25% do PIB (Produto Interno Bruto) gerado pela agroindústria (CEPEA, 2016).

Mesmo sendo o principal produto agrícola brasileiro, a produção da soja sofre anualmente perdas significativas provocadas por fatores abióticos e bióticos (VARSHNEY *et al.*, 2009; FARIAS, 2011). Os fatores abióticos, relacionados a perdas de até 50% da produção (BRAY, 2004), são principalmente a falta ou excesso de água, temperaturas extremas, disponibilidade de nutrientes e as características físicas e químicas do solo (BONATO, 2000; FARIAS, 2011). Já os fatores bióticos, responsáveis por perdas entre 10 e 20% da produção, são ocasionados principalmente por pragas como percevejos e as lagartas *Helicoverpa*, e patógenos, como o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja (KULCHESKI, 2013) e fitonematóides (LOPES, 2009), que parasitam o sistema radicular, reduzindo a absorção de nutrientes e conseqüentemente a produtividade da cultura (ARAÚJO, 2013).

Dessa forma, a busca por medidas que reduzam os impactos ocasionados por esses fatores deve ser uma preocupação constante, visto que,

devido às atuais dimensões dessa *commodity*, quaisquer perdas, mesmo que moderadas, têm impacto significativo na economia nacional (HIRAKURI, 2014).

## 2.2 NEMATOIDES NA CULTURA DA SOJA

Dentre os principais patógenos da soja, os nematoides merecem destaque (LOPES, 2009). Pertencentes ao filo Nematoda, os também denominados “vermes”, possuem o corpo em formato cilíndrico, geralmente alongado e com as extremidades afiladas, com tamanhos variando entre 100µm a alguns centímetros (ROSSETTO e SANTIAGO, 2008; LOPES, 2012). Apesar de sua estrutura anatômica relativamente simples, esses parasitas exibem uma excelente adaptabilidade aos mais distintos nichos ecológicos, podendo ser parasitas obrigatórios a habitantes naturais do solo (FRAGOSO *et al.*, 2007).

Estima-se que, mundialmente, cerca de 12% das perdas agrícolas em diversas culturas sejam ocasionadas por nematoides (WEISCHER e BROWN, 2001), sendo que no Brasil, os prejuízos anuais são estimados em 35 bilhões de reais, onde, desse valor, 46% é causado por perdas na cultura da soja.

Segundo Dias e colaboradores (2010b), até o momento, mais de 100 espécies de nematoides, envolvendo cerca de 50 gêneros, já foram associadas a cultura de soja em todo o mundo. No Brasil, os mais prejudiciais à cultura têm sido os formadores de galhas (*Meloidogyne spp.*), o de cisto (*Heterodera glycines*), reniforme (*Rotylenchulus reniformis*), o das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*).

Os nematoides de galhas, *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* são as espécies mais importantes para a cultura da soja no Brasil, sendo que *M. javanica*, apresenta ocorrência generalizada (DIAS *et al.*, 2010a). Nas raízes infectadas por esses nematoides, são formados conjuntos de células gigantes no cilindro vascular, periciclo e endoderme, ocasionadas pelas substâncias químicas por eles injetadas, levando a deformação e engrossamento das raízes (BONATO, 2000; SEDIYAMA, 2009). Nas lavouras de soja atacadas por esses nematoides, são observadas reboleiras, onde as plantas ficam pequenas e amareladas (GRIGOLLI e ASMUS, 2014).

Juntamente com os nematoides de galhas, os nematoides de cisto da soja (NCS), *H. glycines* também representa um dos principais nematoides que

atacam a cultura da soja (LOPES, 2009). O parasita penetra no sistema radicular, dificultando a absorção de água e nutrientes, resultando em porte reduzido das plantas e clorose na parte aérea, ocasionando muitas vezes a morte da planta (LOPES, 2009; DIAS *et al.*, 2010a; GRIGOLLI e ASMUS, 2014). As raízes infectadas formam os cistos, que se caracterizam pelas fêmeas adultas mortas, sendo que cada cisto pode armazenar mais de 500 ovos, constituindo uma eficiente unidade de dispersão desse nematoide devido a sua estrutura leve e altamente resistente (DIAS *et al.*, 2009).

O nematoide reniforme, *R. reniformis*, apesar de afetar principalmente a cultura do algodão, dependendo de sua população no solo e da cultivar utilizada, também pode ocasionar danos a cultura da soja (LOPES, 2009; DIAS *et al.*, 2010a; GRIGOLLI e ASMUS, 2014). Nos últimos anos, sua ocorrência frequente tem se constituído em motivo de preocupação, especialmente em Mato Grosso do Sul (GRIGOLLI e ASMUS, 2014). Os sintomas nas plantas de soja parasitadas por esse nematoide se caracterizam pela desuniformidade, com grandes áreas de plantas subdesenvolvidas, semelhantes a problemas de deficiência mineral ou de compactação do solo (DIAS *et al.*, 2010a).

Além dos já citados, o parasitismo pelo nematoide causador de lesões radiculares *P. brachyurus* vem ganhando importância nos últimos anos, não somente pelos danos causados a cultura, mas também por sua ampla disseminação e incidência em áreas produtoras no estado do Mato Grosso, onde se concentra a maior produção de soja dentre os estados brasileiros (LOPES, 2012; CONAB, 2017). Além de todos os prejuízos ocasionados diretamente pela ação dos nematoides, deve-se considerar também que o parasitismo acaba por alterar a suscetibilidade da planta, favorecendo a infecção por outros patógenos, tais como fungos, vírus e bactérias (BERGSON, 1971 *apud* GRIGOLLI e ASMUS, 2014).

Dessa forma, os nematoides se consolidam a cada dia no cenário brasileiro como um dos principais problemas fitossanitários que afetam a cultura da soja, podendo inclusive inviabilizar algumas áreas de cultivo (GRIGOLLI e ASMUS, 2014).

### 2.2.1 *Pratylenchus brachyurus*

*Pratylenchus brachyurus*, tradicionalmente chamado de nematoide

causador de lesões radiculares, é um endoparasita migrador e apresenta ampla distribuição geográfica (SILVA *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2010a; UEBEL *et al.*, 2014). Possui o corpo vermiforme, com dimensões entre 0,30 a 0,45mm de comprimento nos estádios juvenis e de 0,5 a 0,7mm quando adultos (FERRAZ *et al.*, 2010), e apresenta um estilete bem desenvolvido, com aproximadamente 20µm de comprimento, com largos bulbos basais (SILVA, 2014).

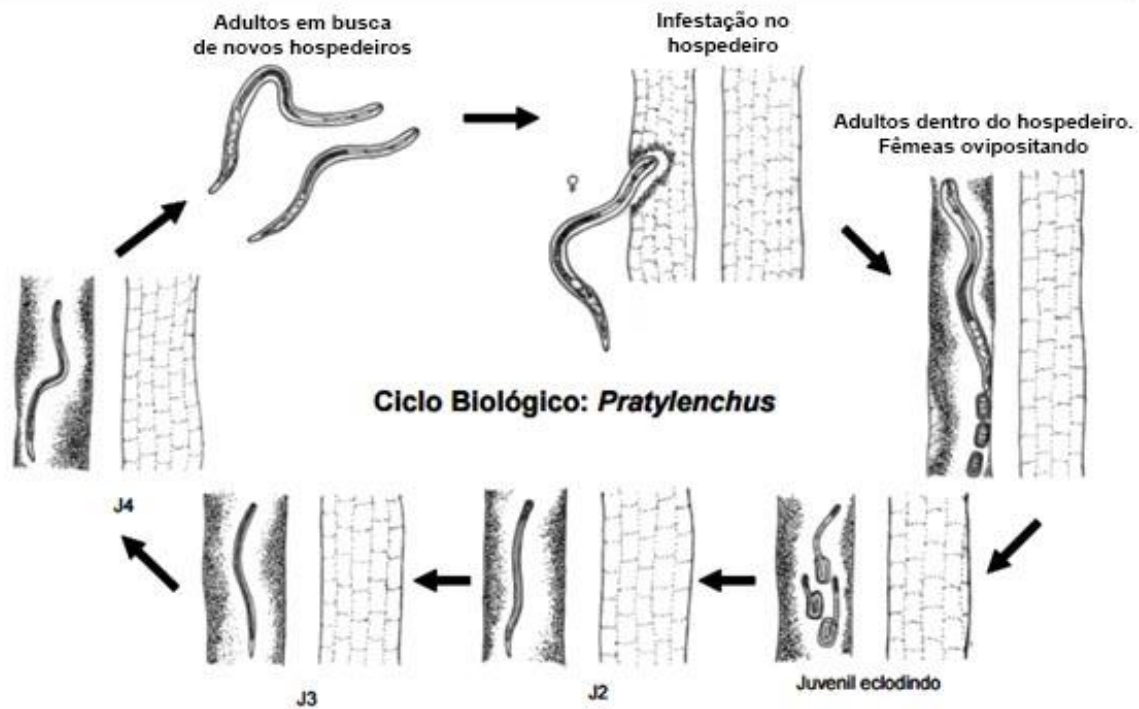
A presença desse nematoide foi relatada pela primeira vez em plantas de abacaxi no Estado do Havaí, nos Estados Unidos (GODFREY, 1929). No Brasil, foi relatada como prejudicial ao milho já no início da década de 60 (SILVA, 2014).

*P. brachyurus* é capaz de parasitar, além da soja, uma grande variedade de espécies vegetais, como a aveia, trigo, milho, arroz, algodão, feijão, cana-de-açúcar, amendoim, café, fumo, guandu, etc, alguns adubos verdes e a maioria das plantas daninhas (GOULART, 2008; DIAS *et al.*, 2010a; GRIGOLLI e ASMUS, 2014). Essa polifagia é favorecida pelo fato da interação entre *P. brachyurus* e o tecido radicular ser menos complexa, pois não há a necessidade de formação de nenhuma célula especializada de alimentação, como ocorre com outros fitonematoides, como os formadores de galhas e cistos (DIAS; *et al.*, 2010b).

Machos e fêmeas de *P. brachyurus* são vermiformes, não havendo dimorfismo sexual acentuado. A presença de machos, no entanto, é rara para esta espécie, sendo sua reprodução por partenogênese (TORRES *et al.*, 2009). Eles penetram através ou entre as células do parênquima cortical, alimentando-se do conteúdo celular, provocando lesões, desorganizando e destruindo as células no local de sua penetração e movimentação (FONSECA, 2012), também tornando a planta predisposta a infecções secundárias de fungos e bactérias (GOULART, 2008).

O ciclo de vida dos nematoides causadores de lesões radiculares compreende seis estádios (Figura 1), sendo o ovo, quatro estádios juvenis (J1 a J4) e a forma adulta. Todas as fases juvenis e adultas são vermiformes, sendo que a partir de J2 os nematoides tem capacidade de se mover até as raízes e são infectivas.

**Figura 1.** Ciclo biológico do nematoide *P. brachyurus*.



Adaptado de Torres *et al.* (2009)

Todo ciclo ocorre na planta, onde uma fêmea coloca em média entre setenta e oitenta ovos no interior dos tecidos vegetais. Um ciclo completo tem duração média entre 3 a 4 semanas (GOULART, 2008). Entretanto, esse tempo é variável em função de fatores como temperatura, umidade e planta hospedeira (CASTILLO e VOVLAS, 2007). Quando as condições do tecido radicular não forem mais favoráveis, ocorre a migração para o solo (FONSECA, 2012).

Segundo Dias e colaboradores (2010b), o parasitismo desse nematoide é caracterizado pela presença de reboleiras onde as plantas apresentam tamanho reduzido, mas sem perder a coloração verde. As raízes das plantas parasitadas apresentam-se parcial ou totalmente escurecidas, resultado das lesões no tecido radicular (Figura 2).

**Figura 2.** Sintomas causados por *P. brachyurus* nas raízes da soja: planta sadia (a) e parasitada (b).



Fonte: DIAS *et al.*(2010b).

Um aspecto importante sobre esta espécie é a possibilidade de ocorrência de interação com outros patógenos, especialmente fungos habitantes de solo, sendo as interações mais frequentes com fungos causadores de murchas, dos gêneros *Fusarium* e *Verticillium* (GRIGOLLI e ASMUS, 2014).

Dentre os fitonematoides, *P. brachyurus* ocupa atualmente o segundo lugar em relação aos impactos econômicos mundiais e nacionais, referentes a diversas culturas agrícolas (GOULART, 2008). As perspectivas são de que logo este se torne o nematoide causador de maior dano na agricultura em todo o mundo, sendo que na região centro-oeste do Brasil, principal região produtora de soja, isso já é uma realidade (FRV, 2014). Trata-se de um grande problema para a cultura da soja, especialmente na região Centro-Oeste do Brasil, onde já foram relatadas perdas de até 30% da produtividade em áreas com altas populações desse parasita (DIAS; *et al.*, 2010b).

Em levantamento realizado no estado do Mato Grosso, foi observada uma frequência de 96% desse nematoide nas culturas desse estado (FONSECA, 2012). Isso se justifica pelo fato de que *P. brachyurus* vem sendo beneficiado especialmente pela incorporação de áreas com solo de textura arenosa, onde sua movimentação é facilitada, e por mudanças no sistema de produção, como a adoção do plantio direto e através da rotação/sucessão de culturas suscetíveis (FALEIRO *et al.*, 2012).

De maneira geral, a real extensão dos danos e perdas causadas por esse nematoide na cultura da soja no Brasil ainda não foram quantificadas. Certo é que as perdas ocasionadas por esse nematoide têm aumentado a cada safra (GOULART, 2008), principalmente pelo fato de que as principais medidas para o controle de fitonematoides não são totalmente eficazes. A rotação/sucessão de culturas, no caso de *P. brachyurus*, não é eficaz, considerando que esse nematoide é capaz de parasitar a grande maioria de espécies vegetais, o que torna a escolha difícil. Uma opção é a rotação com algumas espécies de crotalária. Entretanto, essa cultura não apresenta interesse comercial, o que dificulta seu uso pelos agricultores. Além disso, esta espécie pode sobreviver por vários meses na ausência da planta hospedeira, em solo seco, bem como a exposição a temperaturas extremas (GRIGOLLI e ASMUS, 2014). Já o controle químico por nematicidas e agrotóxicos também apresenta limitações. Além do aumento nos custos de produção e dos riscos de contaminação tanto para o ambiente como para o agricultor e consumidor (JEYARATNAM, 1990), esses produtos não erradicam totalmente os nematoides, ocasionando apenas a redução temporária das populações (TORRES *et al.*, 2009).

### **2.3 EFETORES DO PARASITISMO DE FITONEMATOIDES**

Por se tratar de um patógeno biotrófico, o êxito do parasitismo de fitonematoides é dependente de sua capacidade em estabelecer uma relação com o hospedeiro, que permita a conclusão de seu ciclo de vida sem que ocorra a morte do tecido vegetal (SANTINI, 2014). Para isso, os nematoides secretam proteínas e outras moléculas, denominadas efetores de parasitismo, que interagem diretamente com as moléculas do hospedeiro. A atividade desses efetores, aliada a ação mecânica do estilete, melhoram o seu potencial de colonização, sobrevivência e reprodução no tecido radicular da planta através de modificações na estrutura e função da célula do hospedeiro (HOGENHOUT *et al.*, 2009), ou mesmo interferindo na regulação da resposta de defesa da planta (FERNANDES, 2011; GHEYSEN e MITCHUM, 2011).

A maioria desses efetores é produzida nas glândulas esofágicas (subversal e dorsal) dos nematoides, sendo posteriormente liberadas no citoplasma da célula vegetal por meio do estilete, um órgão retrátil em forma de lança oca, que compõe a boca do parasita (DAVIS *et al.*, 2008).

Esforços têm sido feitos por diversos grupos de pesquisa para elucidar a interação planta-nematoide, através da identificação desses efetores (GAO *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2002; GAO *et al.*, 2004; FRAGOSO *et al.*, 2007). Isso vem sendo realizado por meio de diferentes estratégias envolvendo técnicas moleculares, tais como cDNA-AFLP, microarranjo, hibridização *in situ*, preparação de bibliotecas de cDNA a partir de células da glândula esofágica, além de estudos de proteômica do secretoma de glândulas esofágicas (BELLAFIORE *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a identificação de proteínas secretadas foi facilitada pelo fato de que, em eucariotos, parte dessas proteínas são exportadas pela via secretória geral, com capacidade de reconhecer sequências curtas de aminoácidos, localizadas na região N-terminal, comumente chamadas de peptídeos sinais, facilitando o desenvolvimento de estratégias de predição (TORTO *et al.*, 2003). Isso se deve ao fato de que, atualmente, a predição de genes candidatos é realizada por ferramentas de bioinformática, utilizando algoritmos específicos (JONES e FOSU-NYARKO, 2014), capazes de identificar esses peptídeos sinais com alto grau de precisão (EMANUELSSON *et al.*, 2007).

Sendo assim, sequências que contenham peptídeo sinal são de grande interesse (JONES e FOSU-NYARKO, 2014). Entretanto, nem todas as proteínas efetoras apresentam peptídeo sinal, pois são secretadas por rotas alternativas de secreção (FERNANDES, 2011), sendo necessária a adoção de outros critérios para a predição gênica. Ainda, a busca por sequências similares a efetores identificados em outros nematoides é relevante (JONES e FOSU-NYARKO, 2014).

A primeira proteína efetora descrita em fitonematoides foi uma celulase ( $\beta$ -1,4-endoglucanase), sintetizada nas glândulas subventrais dos nematoides de cisto *Globodera rostochiensis* e *H. glycines*. (SMANT *et al.*, 1998; YAN *et al.*, 1998). Mais tarde, esta enzima também foi observada no secretoma de *M. incognita* (ROSSO *et al.*, 1999), *Globodera tabacum* (GOELLNER *et al.*, 2000) e *Pratylenchus penetrans* (UEHARA, KUSHIDA e MOMOTA, 2001). Essa proteína é expressa durante a penetração e migração desses nematoides no tecido radicular (ROSSO *et al.*, 1999; GOELLNER, WANG e DAVIS, 2001), apresentando um importante papel no estabelecimento do parasitismo desses nematoides. Outras proteínas com atividade hidrolítica, para a digestão dos polímeros da parede celular do tecido vegetal, com função associada a penetração e migração nas raízes

também foram descritas, tais como endoglucanases, xilanases (ROSSO *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2002), pectato liases e poligalacturonases (POPEIJUS *et al.*, 2000; DOYLE e LAMBERT, 2002).

Gal e colaboradores (2006) caracterizaram uma expansina secretada por *M. javanica*. Estas atuam rompendo as pontes de hidrogênio entre polímeros de celulose e hemicelulose da parede celular vegetal (MCQUEEN-MASON e COSGROVE, 1995), tornando-a mais frouxa e facilitando assim a formação de células gigantes (COSGROVE, 1999). O silenciamento dessa proteína em plantas de tomate, as tornaram menos suscetíveis a infecção ao nematoide.

Também em *M. javanica*, Doyle e Lambert (2003) observaram que a superexpressão de uma corismato mutase do parasita em raízes de soja, resultou na redução das radículas laterais, em consequência da redução da biossíntese de ácido indol-acético (AIA). Além delas, diversas proteases são secretadas (SOUZA JÚNIOR, 2012), com funções atribuídas no mecanismo de parasitismo, como a evasão do sistema imune, invasão de tecidos, bem como a degradação de proteínas do hospedeiro (COOMBS e MOTTRAM, 1997).

Em nematoides migradores, Vieira e colaboradores (VIEIRA *et al.*, 2015), em busca por proteínas efetoras no transcriptoma de *Pratylenchus penetrans*, identificaram peptidases fortemente representadas, reforçando a ideia de que essas proteínas atuam na digestão dos polímeros da parede celular do tecido vegetal.

Jones e Fosu-Nyarko(2014), identificaram a presença de ubiquitinas no transcriptoma de *Pratylenchus thornei*, *Pratylenchus coffeae* e *Pratylenchus zaeae*, que atuam provavelmente explorando o sistema de ubiquitinação do hospedeiro, influenciando no destino de suas proteínas, possivelmente promovendo e/ou regulando sua degradação.

Jaubert e colaboradores(2004) identificaram no secretoma de *M. incognita*, a presença de proteínas da família 14-3-3, preditas por mediar interações entre proteínas, sugerindo que atuem como efetores no parasitismo desse nematoide. Ainda, Klink e colaboradores (2009) sugerem que uma 14-3-3 identificada no secretoma de *H. glycines* tenha um papel fundamental na invasão do tecido radicular, o que reforça a hipótese de que proteínas dessa família atuem como efetores do parasitismo de fitonematoides.

### 2.3.1 Família 14-3-3

Essas proteínas constituem uma família de proteínas regulatórias, altamente conservadas em organismos eucariotos, sendo que até o momento, não foram descritas em procariotos (FU, SUBRAMANIAN e MASTERS, 2000). São importantes para a manutenção de processos celulares e bioquímicos através da interação com proteínas-alvo fosforiladas (MUSLIN *et al.*, 1996; DE BOER, VAN KLEEFF e GAO, 2013).

As 14-3-3s foram identificadas inicialmente em proteínas do cérebro de mamíferos, relacionadas a síntese de neurotransmissores, e recebem essa denominação com base no fracionamento em cromatografia DEAE-celulose e perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (MOORE, 1967). Monômeros dessas proteínas apresentam ponto isoelétrico de próximo de 5, e peso molecular de aproximadamente 30kDa, entretanto, em sua conformação nativa, formam dímeros, podendo ser homo ou heterodímeros (JONES, LEY e AITKEN, 1995).

As proteínas dessa família apresentam-se em isômeros, variando em quantidade de acordo com o organismo. Em mamíferos, por exemplo, são 7 isoformas, enquanto que em *Saccharomyces cerevisiae* apenas duas (CHEVALIER, MORRIS e WALKER, 2009). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 15 genes preditos, sendo que 13 tiveram sua expressão confirmada (ROSENQUIST *et al.*, 2001).

Proteínas 14-3-3s têm sido associadas a diversos processos biológicos essenciais a plantas, animais e leveduras (JAUBERT *et al.*, 2004), onde múltiplas funções são atribuídas a elas (OTTMANN, 2013). Podem atuar como adaptadores, mediando a interação entre duas proteínas (JAUBERT *et al.*, 2004; DAVIS, HUSSEY e BAUM, 2009). Isso é justificado pelo fato de que cada monômero da estrutura das 14-3-3s pode interagir com um sítio protéico diferente. Dessa maneira, cada dímero pode interagir com dois sítios da mesma proteína, ou de proteínas diferentes (XIAO *et al.*, 1995; SMITH, DAUT e SCHWAPPACH, 2011). Isso permite que as 14-3-3s estabeleçam o contato entre duas proteínas, promovendo alterações na atividade protéica através de mudanças conformacionais, de localização subcelular ou encobrendo um sítio específico (XIAO *et al.*, 1995; OBSIL e OBSILOVA, 2011; SMITH, DAUT e SCHWAPPACH, 2011).

Jaubert e colaboradores (2004), sugerem que as 14-3-3s também

podem atuar como chaperonas, assumindo conformação das proteínas-alvo ou mesmo prevenindo a proteólise. Sehnke, Delille e Ferl (2002) sugerem o envolvimento das 14-3-3s na regulação de fosfatases e proteínas quinases, envolvidas na transdução de sinal. Elas podem também ter envolvimento na regulação do ciclo celular (MITCHUM *et al.*, 2007), transcrição, metabolismo primário, resposta de defesa (SILES-LUCAS *et al.*, 2003; BERG e TAYLOR, 2008) e distribuição intracelular de proteínas (JONES, GHEYSEN e FENOLL, 2011).

No nematoide modelo *Caenorhabditis elegans*, Araiz, Château e Galas (2008) observaram a interação entre proteínas 14-3-3s e proteínas que regulam o tempo de vida desse nematoide. Essa interação promove a ligação entre duas vias de sinalização que controlam a longevidade e restrição calórica desse parasita, insulín/IGF-1.

Em fitonematóides, Jaubert e colaboradores (2004) identificaram em secreções do estilede de juvenis (J2) de *M. incognita*, duas isoformas de proteínas 14-3-3 (14-3-3a e 14-3-3b). Foi observado que a isoforma 14-3-3b teve sua expressão identificada na glândula esofágica do patógeno, por método de hibridização *in situ*, um importante indicativo de que essa proteína é secretada. Em nematóides de cisto, Klink e colaboradores (2009) sugerem que uma 14-3-3 atue como efetora do parasitismo de *H. glycines*, envolvida na invasão do tecido radicular e indução e manutenção do sítio de alimentação.

Fosu-Nyarko e colaboradores (2016) em trabalho recente, identificaram no transcriptoma de *P. zaeae*, uma sequência correspondente a uma 14-3-3, homóloga a obtida por Jaubert e colaboradores (2004).

Apesar dos diversos estudos envolvendo essa família em diferentes organismos, os poucos dados a cerca do papel dessas proteínas na interação planta-nematoide torna difícil a definição de sua função.

## **2.4 RNA INTERFERENTE COMO FERRAMENTA PARA VALIDAÇÃO FUNCIONAL DE GENES**

A tecnologia de RNA interferente (RNAi) explora o mecanismo celular de silenciamento gênico pós transcricional, processo que ocorre naturalmente tanto em plantas quanto em outros organismos eucarióticos (LOURENÇO, 2014). O silenciamento de genes a nível pós-transcricional pode ocorrer tanto pela degradação do mRNA ou pelo bloqueio de sua tradução (OBBARD *et al.*, 2009),

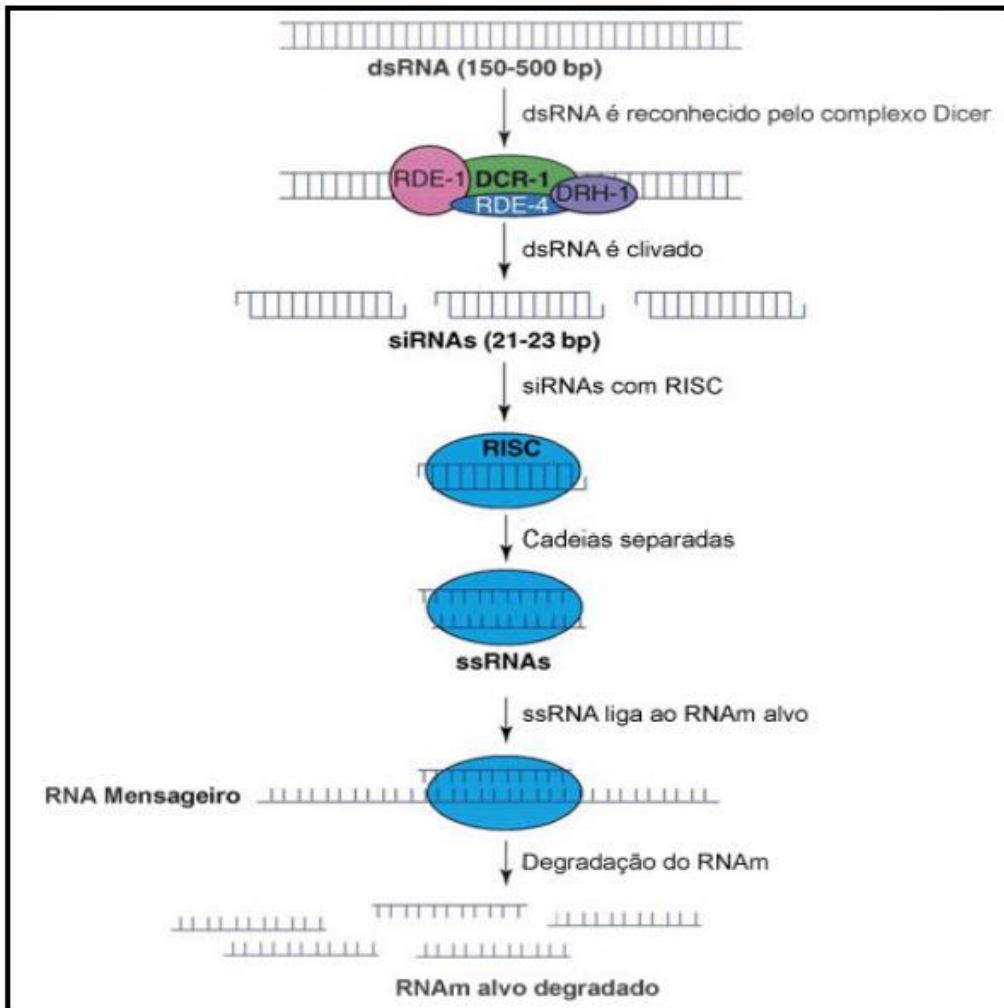
reduzindo ou anulando a atividade de genes de forma específica. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez em plantas (petúnias) no início da década de 1990, onde, na tentativa de intensificar a cor púrpura dessas flores, foram desenvolvidas plantas transgênicas superexpressando genes responsáveis pela produção de pigmentos. Ao invés de ocorrer uma maior pigmentação, as flores se apresentaram brancas. Na época, esse fenômeno foi chamado de co-supressão, pois tanto as cópias extras quanto os genes endógenos foram silenciados (NAPOLI, LEMIEUX e JORGENSEN, 1990).

A primeira descrição de silenciamento gênico mediado por RNAi em animais foi obtida em *C. elegans*, um nematoide de vida livre e organismo modelo (FIRE *et al.*, 1998). Nesse estudo, concluiu-se que os efeitos dos RNAi nos nematoides puderam ser observados em células distantes e também em seus descendentes, indicando a presença de um mecanismo de transporte nas células. Os autores então concluíram que o fenômeno do RNAi em nematoides é induzido por moléculas de RNA de dupla fita, e de forma sistêmica e hereditária (LOURENÇO, 2014). Esse processo recebeu o nome de silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (JORGENSEN *et al.*, 1996).

Acreditava-se inicialmente, que o mecanismo de RNAi era utilizado apenas como uma forma de defesa contra infecções por vírus ou contra os efeitos da movimentação de transposons. Atualmente, sabe-se que esse mecanismo participa de forma integral na regulação da expressão gênica desses organismos (LILLEY *et al.*, 2007).

A via de RNAi em nematoides apresenta inicialmente um processamento comum que se desdobra em quatro etapas funcionais (Figura 3) (ROSSO, JONES e ABAD, 2009). Após ser introduzido no organismo (pode ser obtido a partir da transcrição do DNA de dupla fita do organismo, ou ser exógeno), o RNAi é reconhecido e clivado pelo complexo Dicer, produzindo pequenos fragmentos de RNA, os chamados “small interfering RNAs (siRNAs)”, que interagem com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Em seguida, uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita antisense do duplex guie o complexo até o mRNA alvo. Ao final, uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o mRNA, degradando-o e, por consequência, o silencia (MARTINEZ *et al.*, 2002).

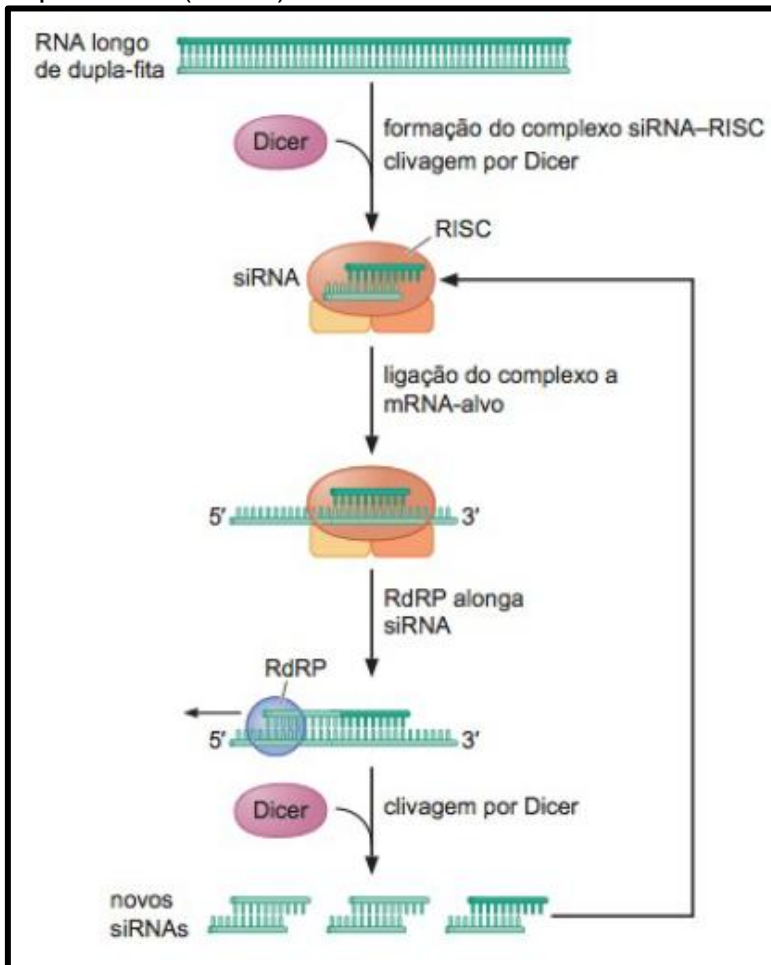
**Figura 3.** Via de geração de siRNAs e silenciamento gênico em *C. elegans*.



Fonte: Rosso, Jones e Abad(2009).

Uma característica importante sobre o mecanismo de RNA interferente é a sua eficiência, visto que pequenas quantidades de dsRNA são suficientes para induzir o silenciamento dos genes-alvo. Isso pode ser justificado pelo fato de que em alguns organismos como plantas e *C. elegans* (BERNSTEIN, DENLI e HANNON, 2001; DALMAY *et al.*, 2001; SIJEN *et al.*, 2001), ocorre um processo de retroalimentação pela ação de uma RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP) que “recruta” as moléculas de siRNA geradas que, após se ligarem ao mRNA, as utiliza como iniciadores de polimerização, gerando novas moléculas de dsRNA específicas, que re-iniciam a geração de mais siRNAs, amplificando exponencialmente o efeito de silenciamento gênico (WATSON *et al.*, 2015) (Figura 4).

**Figura 4.** Amplificação do sinal de siRNA pela enzima RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP)



Fonte: Watson e colaboradores (2015).

Fire e colaboradores (1998), em estudo com o nematoide modelo *C. elegans*, evidenciaram também que essa ferramenta pode ser utilizada *in vitro* sob diferentes formas: pela ingestão de bactérias expressando um RNAi complementar a um gene presente em seu organismo; pela microinjeção de RNAi diretamente no corpo do nematoide; ou pela ingestão do RNAi pelo método de “soaking”. No caso dos fitonematoides, a administração por microinjeção é dificultada pelas dimensões dos fitonematoides (ROSSO, JONES e ABAD, 2009). Além disso, a ingestão de substâncias sem o contato com qualquer tecido radicular é improvável, visto que esses nematoides não se alimentam até que ocorra a penetração no tecido radicular (ATKINSON, URWIN e MCPHERSON, 2003).

De forma geral, estudos *in vitro* de genômica funcional em fitonematoides são conduzidas pela metodologia de Soaking, que consiste na incubação dos nematoides em solução contendo RNA dupla fita (double strand RNA

- dsRNA) correspondente ao gene que se deseja silenciar. Para que os nematoides se alimentem da solução de soaking, é necessária a utilização de substâncias estimulantes neuroativas. Essa metodologia foi descrita inicialmente por Tabara, Grishok e Mello (1998) utilizando o nematoide modelo *C. elegans*.

A primeira demonstração da aplicação dessa técnica em fitonematoides foi no nematoide de cisto *H. glycines*. A ingestão de dsRNA correspondente a uma sequência homóloga da proteína lectina tipo C resultou em uma redução de 41% no número de nematoides estabelecidos em plantas de soja (URWIN, LILLEY e ATKINSON, 2002).

Huang e colaboradores (2006) observaram uma redução entre 74 e 81% no número de nematoides estabelecidos em *Arabidopsis* após o silenciamento do gene 16D10, que codifica a síntese de um peptídeo secretado em *M. incognita*.

Além dos trabalhos já citados, vários autores obtiveram importantes resultados através do silenciamento de genes-alvo via soaking, tais como uma dual oxidase em *M. incognita* (BAKHETIA *et al.*, 2005);  $\beta$ -1,4-endoglucanase em *Globodera rostochiensis* (CHEN *et al.*, 2005) e *M. incognita* (BAKHETIA, URWIN e ATKINSON, 2007), aminopeptidase em *H. glycines* (LILLEY *et al.*, 2005), heat shock protein 70 em *Bursaphelenchus xylophilus* (PARK *et al.*, 2008), entre outras (Tabela1).

No caso específico dos nematoides causadores de lesões radiculares, Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013), em ensaios de silenciamento de sequências homólogas a *C. elegans* correspondentes a genes essenciais para a contração muscular e locomoção (*pat-10* e *unc-87*) em *Pratylenchus thornei*, observaram redução na sua reprodução em cilindros de cenoura entre 77% (*pat-10*) e 81% (*unc-87*). Em *Pratylenchus coffeae*, o silenciamento dos mesmos genes resultou em significativa redução da motilidade, onde, apenas 6 e 7% dos nematoides tratados com dsRNA de *pat-10* e *unc-87*, respectivamente, mantiveram a capacidade migratória após 12 horas (JOSEPH, GHEYSEN e SUBRAMANIAM, 2012).

**Tabela 1.** Relação de genes de fitonematoides efetivamente silenciados por RNAi.

Gene silenciado	Nematoide	Método de administração	Fenótipo	Referências
C-typelectin	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓41% no número de nematoides estabelecidos	(URWIN, LILLEY e ATKINSON, 2002)
Cysteine proteinase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓40% no número de nematoides estabelecidos	(URWIN, LILLEY e ATKINSON, 2002)
Dual oxidase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓>70% no número de nematoides estabelecidos; ↓fecundidade	(BAKHETIA <i>et al.</i> , 2005)
β-1,4-endoglucanase pharyngea	<i>G. rostochiensis</i>	Soaking	↓50% no número de nematoides estabelecidos	(CHEN <i>et al.</i> , 2005)
Secretedamphidprotein	<i>G. rostochiensis</i>	Soaking	↓ da capacidade de invasão do tecido radicular	(CHEN <i>et al.</i> , 2005)
Chitinsynthase	<i>M. artiellia</i>	Soaking	Atraso na eclosão de ovos	(FANELLI <i>et al.</i> , 2005)
Aminopeptidase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓61% no número de fêmeas férteis	(LILLEY <i>et al.</i> , 2005)
Secretedpeptide	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓74%–81% no número de nematoides estabelecidos	(HUANG <i>et al.</i> , 2006)
Ribosomalprotein	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓viabilidade dos J2	(ALKHAROUF, KLINK e MATTHEWS, 2007)
β-1,4-endoglucanase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ no número de nematoides estabelecidos	(BAKHETIA, URWIN e ATKINSON, 2007)
Secretedpeptide SYV46	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ no número de nematoides estabelecidos	(BAKHETIA, URWIN e ATKINSON, 2007)
Glutathione-S transferase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓52%–71% da fecundidade	(DUBREUIL <i>et al.</i> , 2007)
FMRFamide-likepeptides	<i>G. pallida</i>	Soaking	Inibição de motilidade	(KIMBER <i>et al.</i> , 2007)
Cysteine proteinase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓60% no número de nematoides estabelecidos	(SHINGLES <i>et al.</i> , 2007)
Heat shock protein 70, cytochrome C	<i>B. xylophilus</i>	Soaking	↓ da viabilidade de J2-J3 sob elevada temperatura	(PARK <i>et al.</i> , 2008)
Myosin heavy chain, tropomyosin	<i>B. xylophilus</i>	Soaking	↓ da viabilidade de J2-J3 sob elevada temperatura; motilidade anormal	(PARK <i>et al.</i> , 2008)
Esophagealglandsecretedprotein	<i>M. incognita</i>	Soaking	Supressão do desenvolvimento do ciclo de vida; ↓galhas, massa de ovos e ovos por grama de raiz	(SÁ, 2011)
Troponin C, Protein of maintenance of structure of myofilaments in body wall muscle cells	<i>P. coffeae</i>	Soaking	Redução significativa da capacidade migratória	(JOSEPH, GHEYSEN e SUBRAMANIAM, 2012)
Troponin C, Protein of maintenance of structure of myofilaments in body wall muscle	<i>P. thornei</i> <i>P. zaeae</i>	Soaking	Redução de 77-81% da reprodução em cilindros de cenoura	(TAN, JONES e FOSU-NYARKO, 2013)

<b>cells</b>				
<b>Calreticulin</b>	<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Soaking	↓fecundidade	(FENG <i>et al.</i> , 2015)
<b>Integrase</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓>90% no número de nematoides estabelecidos	(YADAV, VELUTHAMBI e SUBRAMANIAM, 2006)
<b>Splicingfactor</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓>90% no número de nematoides estabelecidos	(YADAV, VELUTHAMBI e SUBRAMANIAM, 2006)
<b>Secretedpeptide</b>	<i>M. arenaria</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. hapla</i> , <i>M. arenaria</i>	<i>In planta</i>	↓63%–90% do número de galhas; ↓ de tamanho das galhas	(HUANG <i>et al.</i> , 2006)
<b>Major spermprotein</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓>68% no número de ovos	(STEEVES <i>et al.</i> , 2006)
<b>Ribosomalprotein 3a</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓87% nos cistos das fêmeas	(KLINK <i>et al.</i> , 2009)
<b>Ribosomalprotein 4</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓81% nos cistos das fêmeas	(KLINK <i>et al.</i> , 2009)
<b>Spliceosomal SR protein</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓88% nos cistos das fêmeas	(KLINK <i>et al.</i> , 2009)
<b>Synaptobrevin</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓93% nos cistos das fêmeas	(KLINK <i>et al.</i> , 2009)
<b>Ubiquitin-like</b>	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓23%–64% no desenvolvimento de fêmeas	(SINDHU <i>et al.</i> , 2009)
<b>Cellulosebindingprotein</b>	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓12%–47% no desenvolvimento de fêmeas	(SINDHU <i>et al.</i> , 2009)
<b>SKP1-like</b>	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓>50%no desenvolvimento de fêmeas	(SINDHU <i>et al.</i> , 2009)
<b>Zincfingerprotein</b>	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓42% no desenvolvimento de fêmeas	(SINDHU <i>et al.</i> , 2009)
<b>Beta subunit of the COPI complex</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓81% no número de ovos	(LI <i>et al.</i> , 2010)
<b>Pre-mRNAsplicingfactor</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓79% no número de ovos	(LI <i>et al.</i> , 2010)
<b>Unknownprotein</b>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓95% no número de ovos	(LI <i>et al.</i> , 2010)
<b>Tyrosinephosphatase</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓92% formação de galhas	(IBRAHIM <i>et al.</i> , 2011)
<b>Mitochondrial stress-70 protein</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓94,7% formação de galhas	(IBRAHIM <i>et al.</i> , 2011)
<b>Proteases</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓fecundidade; ↓taxa de eclosão de J2	(SOUZA JÚNIOR, 2012)
<b>Neuropeptídeo</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓50-80% fecundidade	(PAPOLU <i>et al.</i> , 2013)
<b>Spliceosomesubunit</b>	<i>P. vulnus</i>	<i>In planta</i>	↓ 79% nematoides por planta	(WALAWAGE <i>et al.</i> , 2013)
<b>Isocitratoliase</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓65% ovos por g de raiz	(LOURENÇO, 2014)
<b>Hsp90</b>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓30% ovos por g de raiz	(LOURENÇO, 2014)

Adaptado de Li e colaboradores (2011).

Uma estratégia alternativa ao soaking para estudo de genes via silenciamento que vem sendo empregada com sucesso é a produção de dsRNA *in planta*, onde a planta é geneticamente modificada para expressar dsRNAs através de um vetor binário contendo o fragmento gênico de interesse (LOURENÇO, 2014). Esses dsRNAs produzidos são então processados pela maquinaria de PTGS do hospedeiro, gerando pequenos RNAs de interferência (siRNA), que são então ingeridos pelo nematoide quando do momento da infecção.

O emprego dessa estratégia em fitonematoides foi relatada inicialmente por Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006), que observaram redução superior a 90% no parasitismo de *M. incógnita* em plantas de tabaco após o silenciamento de genes codificando a síntese de uma integrase e fator de splicing.

Huang e colaboradores (HUANG *et al.*, 2006) observaram em plantas de *A. thaliana* expressando um dsRNA complementar ao peptídeo 16D10 secretado por *M. incógnita* uma redução entre 63-90% no número de galhas, além na diminuição da fecundidade desse nematoide.

Recentemente, Hunter e colaboradores (HUNTER *et al.*, 2012) propuseram a utilização de uma metodologia que consiste na entrega de dsRNA *in planta* sem que seja necessário qualquer evento de transformação genética da planta. Ela se baseia na absorção do dsRNA via tecido radicular, tirando proveito de que em plantas, além de ocorrer a disseminação de dsRNA através dos tecidos, a própria maquinaria de silenciamento é capaz de amplificar o dsRNA através de uma RNA-polimerase RNA dependente (RdRP). Ainda não estão disponíveis relatos acerca da aplicação da metodologia de entrega de dsRNA via radicular em estudos envolvendo fitonematoides. Entretanto, resultados em trabalhos envolvendo insetos deixa claro o potencial de aplicação em outros organismos, como os fitonematoides.

Hunter e colaboradores (2012) e Li e colaboradores (2015) demonstraram que insetos que se alimentaram de plantas onde foi administrado dsRNA via absorção radicular, foram capazes de ingerir o dsRNA translocado através dos tecidos. Se trata, portanto, de uma técnica menos onerosa quando comparada com a entrega via soaking e com a produção de um organismo geneticamente modificado. A metodologia vem sendo conhecida como Aplicação Ectópica (AE) de dsRNA.

Nos últimos anos, o silenciamento gênico mediado pela tecnologia de RNAi se tornou uma importante ferramenta biotecnológica, sendo empregada

com sucesso para estudo de genes envolvidos no parasitismo de diversos organismos, incluindo fitonematoides, possibilitando assim que alterações fenotípicas causadas pelo silenciamento de genes candidatos, levem a uma inferência a respeito de sua função no estabelecimento do parasitismo (MARQUES, 2008).

O conhecimento da maquinaria necessária ao silenciamento gênico mediado por RNAi (FIRE *et al.*, 1998; ELBASHIR *et al.*, 2001; PADDISON *et al.*, 2002; PAUL *et al.*, 2002), aliado a disponibilização do genoma e transcriptoma (DUTTA, BANAKAR e RAO, 2015) de diversas espécies, vem permitindo a utilização dessa ferramenta em estudos envolvendo genômica funcional e manipulação da expressão de genes alvo (LOURENÇO, 2014), possibilitando o entendimento sobre a função de genes essenciais ao parasitismo de alguns nematoides.

### 3 OBJETIVO GERAL

Padronizar um método para estudo funcional em *P. brachyurus* via silenciamento gênico pós transcricional (RNAi), seguida da caracterização do candidato a efector de PB6584.1.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar metodologias *in vitro* (Soaking) e *in vivo* (Aplicação Ectopica de dsRNA) para o estudo funcional de genes em *P. brachyurus*;

Determinar a capacidade de ingestão de moléculas de dsRNA em *P. brachyurus*;

Determinar a estabilidade e translocação de moléculas de dsRNA via AE em raízes de soja;

Caracterizar o perfil de expressão do candidato a efector PB6584.1 de *P. brachyurus* durante a interação com a soja, bem como nas diferentes fases infectivas e não infectivas do nematoide;

Avaliar o efeito do silenciamento do candidato a efector PB6584.1 de *P. brachyurus*, via Soaking, sobre a colonização dos nematoides em cilindros de cenoura;

Avaliar o efeito do silenciamento do candidato a efector de *P. brachyurus*, via Soaking e AE de dsRNA, sobre a colonização dos nematoides em soja.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO DO GENE CANDIDATO

Nos últimos anos, o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja – Londrina, Paraná vem realizando pesquisas buscando o entendimento da interação planta-nematoide. Entre essas pesquisas, destaca-se a caracterização de proteínas do patógeno *P. brachyurus*, potencialmente envolvidas no sucesso de seu parasitismo. A partir dos dados provenientes do transcriptoma de raízes de soja das cultivares BRSGO Chapadões (resistente) e TMG115RR (suscetível), infectadas por *P. brachyurus*, o grupo realizou a predição *in silico* do secretoma e de candidatos a genes efetores desse nematoide (dados não publicados). Após a filtragem de reads de soja, *Bradyrhizobium* spp. e *Escherichia coli* (visando eliminar possíveis contaminações), seguiu-se a montagem de contigs de transcritos de *P. brachyurus* com o emprego do programa Trinity assembler (GRABHERR *et al.*, 2011). A predição *in silico* do secretoma e genes efetores de *P. brachyurus* passou pela análise de presença de peptídeo sinal, ausência de domínio transmembrana, localização subcelular, além da ferramenta Blast frente a diferentes bancos de dados de proteínas secretadas já descritas em outras espécies, buscando a identificação de ortólogos em *P. brachyurus*.

Para este estudo, o candidato PB6584.1, com uma sequência predita de 992pb, foi selecionado para as análises de caracterização funcional via RNAi. Este gene, predito como candidato a efector pelas análises *in silico*, teve sua expressão identificada na glândula esofágica do patógeno, por método de hibridização *in situ* (dados não publicados), um importante indicativo de seu envolvimento no parasitismo. Além disso, as análises de homologia de sequência, com outros efetores já descritos, demonstram sua alta similaridade com uma proteína da família 14-3-3, proteína descrita como efector em espécies de nematoides, como *Meloidogyne* sp., *Heterodera* sp. e *Globodera* sp. (JONES e FOSU-NYARKO, 2014).

### 4.2 PREPARO DO INÓCULO

Para a obtenção do inóculo utilizado nos experimentos, populações de *P. brachyurus* foram multiplicadas em casa de vegetação do setor de

Nematologia da Embrapa Soja, em plantas de amendoim, por 90 dias. As raízes das plantas infectadas foram processadas de acordo com a técnica de Coolen e D'herde (1972), lavadas, cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador, para extração dos nematóides. Posteriormente, as amostras foram passadas em peneiras de 200 e 500 meshes e, após enxágue com água corrente, o conteúdo retido na peneira de 500 meshes foi recuperado em beakers. O material obtido foi quantificado em câmara de Peters, utilizando 1mL da suspensão para a projeção do número total de indivíduos.

### 4.3 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDO FUNCIONAL DE GENES DE *P. BRACHYURUS* VIA PTGS

#### 4.3.1 Obtenção do dsRNA

Neste estudo, foram utilizadas moléculas de dsRNA sintetizadas pela empresa agroRNA (Seul, Coréia do Sul), com tamanho variando entre 156 e 502pb, conforme tabela 2. Além da sequência referente ao candidato a efetor, também foi sintetizado um dsRNA correspondente a uma região do gene GFP (green fluorescente protein – dsRNA-GFP), utilizado tanto como controle negativo nos ensaios, como na validação das metodologias, pois se trata de uma sequência sem complementaridade tanto com os transcritos da soja como do patógeno.

**Tabela 2.** Sequências das moléculas de dsRNA utilizadas.

Identificação	Sequência	Tamanho (pb)
PB6584.1	GACTGAGGGATCCGAAAAGAAGCAACAAATG GCGAAGGAATACCGCGAGAAGGTCGAGCGC GAATTGCGCGACATTTGCCACGACGTTCTGG ACTTGCTTGACAAATACTTGATCCCGAAGGCC GGTAACCCCGAGTCCAAGGTGTTCTACTTGA A	156pb
GFP	TCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATA CGGAAACTTACCTTAAATTTATTTGCACTAC TGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTG TCACTACTTTCTCTTATGGTGTTC AATGCTTTT CAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGA CTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATAC GTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACG ACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAA GTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATC GAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACG GAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAA	502pb

	CTACAACTCCCACAACGTATACATCATGGCAG ACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTC AAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGT TCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTC CAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACC	
--	--	--

#### 4.3.2 Ensaio de Fornecimento de dsRNA via “Soaking”

Para o estabelecimento de um método para fornecimento de dsRNA a *P. brachyurus* via soaking, foi utilizada a metodologia descrita por Tabara, Grishok e Mello (1998) e adaptada por Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013) para este gênero de fitonematoides, sendo utilizado a molécula de dsRNA-GFP para os testes.

Para isso, 2000 indivíduos foram submersos em tampão M9 (43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM NaCl, 4,6 mM NH<sub>4</sub>Cl) acrescido de dsRNA (2 mg/mL) e octopamina (50 mM) (para estimular a ingestão do dsRNA do meio pelo nematoide). Os juvenis foram incubados por 16 horas a 22°C sob o abrigo da luz.

Para a confirmação da absorção da solução contendo dsRNA pelo nematoide, foram incluídos dois tratamentos sob as mesmas condições já citadas com dsRNA-GFP. O primeiro acrescido do marcador fluorescente repórter da ingestão FITC – (Fluorescein isothiocyanate Isomer I) (1 mg/mL), e o segundo utilizando moléculas de dsRNA-GFP marcadas covalentemente com o fluorocromo Cy3 (0,1 mg/mL).

Após a incubação, cada amostra contendo os juvenis foi centrifugada a 2000g por 2 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta e adicionou-se 1mL de água ultrapura para a retirada do excesso da solução de incubação. O processo foi repetido por 5 vezes. Em seguida, foi realizada a confirmação da ingestão da solução marcada com FITC e Cy3 em microscópio óptico de fluorescência sob filtro específico. De forma complementar, foi realizada a confirmação da absorção da solução por reação de PCR utilizando primers específicos para uma região de 206 pb do gene GFP. Para isso, foram coletadas três alíquotas de aproximadamente 100 indivíduos de *P. brachyurus* cada e foi realizada a extração do RNA. A reação de PCR para a detecção do dsRNA-GFP nos nematoides, consistiu em misturas contendo 18,3µL de água Milli-Q, 2,5µL de tampão de PCR [10x], 1µL de MgCl<sub>2</sub>[50mM], 1µL de dNTPs Mix [2,5mM], 0,5µL de cada iniciador [10µM] F2 (5'-TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT-

3') e R2 (5'- GGTCCTCTCCTGCACGTATC-3'), 0,2µL de Taq DNA Polimerase [5U/µL] (Invitrogen) e 1µL de cada amostra de RNA [300ng], com volume final de 25 µL. Como controle, foram utilizados como molde 50ng do dsRNA de GFP, além do branco (contendo todos os reagentes exceto cDNA/ RNA molde). A reação foi incubada em termociclador para a amplificação dos fragmentos, utilizando-se o programa: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72° por 30 segundos e uma etapa de 72° por 7 minutos. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% contendo tampão SB 1x, pH 8,5, corado com brometo de etídio (10mg/mL). Para a aquisição e armazenamento das imagens, foi utilizado o transluminador e fotodocumentador Loccus.

#### 4.3.3 Ensaio de fornecimento de dsRNA via Aplicação Ectópica na Raíz

A aplicação ectópica de dsRNA foi descrita inicialmente por Hunter e colaboradores (2012), e consiste na aplicação de dsRNA *in planta*, sem a realização de qualquer evento de transformação. A fim de se validar a viabilidade dessa metodologia em plantas de soja, foi instalado um experimento com delineamento inteiramente casualizado, onde sementes da cultivar suscetível a infecção TMG115RR foram irrigadas por três dias em vaso contendo areia autoclavada e, cinco dias após emergirem, foram transferidas para tubetes contendo areia (1 planta por tubete). Após as plantas atingirem o estágio de desenvolvimento V1 (formação do primeiro trifólio), o fornecimento de água foi suspenso por dois dias. Em seguida, 10µg de dsRNA-GFP (volume final de 2 mL) foram aplicados diretamente na raiz com auxílio de micropipeta. Após 12 horas, cada planta foi inoculada com 1000 indivíduos em volume final de 4 mL (250 indivíduos/mL). O experimento foi conduzido em casa de vegetação do setor de nematologia da Embrapa Soja. Como controle, foram utilizadas plântulas sem a aplicação de dsRNA-GFP.

Para se avaliar a translocação, permanência e estabilidade do dsRNA-GFP nas plantas de soja, foram realizadas coletas das folhas do primeiro trifólio e raiz de três réplicas de cada repetição nos tempos de 12, 24, 48, 96hai (horas após a inoculação) e 60 dai (dias após a inoculação). O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, macerado e armazenado em

ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O RNA total de cada amostra foi extraído utilizando o reagente TRIZOL™ (Invitrogen, Carlsbed, CA, EUA). Em microtubos de 1,5mL, 100mg do tecido macerado foi acrescido de 1mL de Trizol, agitado em vórtex e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionou-se 200 $\mu\text{L}$  de clorofórmio. A amostra foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, seguida de vigorosa agitação por 15 segundos, incubação a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 12.000g por 15 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi transferida para novo tubo e adicionou-se 0,5mL de isopropanol, seguida de suaves inversões (20x), iniciando a formação do pellet de precipitação do RNA. A amostra foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 12.000g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O isopropanol foi descartado por inversão e adicionou-se 1mL de etanol 75%, seguido de centrifugação a 7.500g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O etanol foi removido e o tubo foi invertido sobre papel absorvente por 5 minutos a temperatura ambiente para secagem do precipitado. Por fim, o precipitado foi solubilizado em 30 $\mu\text{L}$  de água destilada ultrapura livre de ribonucleases (Invitrogen).

Todos os utensílios utilizados foram tratados com RNase AWAY™ (Life Technologies, Carlsbed, CA, EUA), para a remoção de ribonucleases. A concentração do RNA total das amostras foi determinada em espectrofotômetro (nanodrop) a 230nm e a integridade foi confirmada em gel de agarose a 1% (p/v) corado com solução de brometo de etídio em tampão SB 1x(NaOH 10mM), pH 8,5. As amostras foram mantidas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A avaliação da mobilidade, permanência e estabilidade do dsRNA-GFP no tecido vegetal foi realizada por PCR, conforme item 4.3.2. Além das reações com as amostras do experimento, foram incluídas como controle, amostras de cDNA de soja e *P. brachyurus*, dsRNA-GFP e branco (contendo todos os reagentes exceto cDNA/ RNA molde).

#### **4.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CANDIDATO A EFETOR DE *P. BRACHYURUS***

##### **4.4.1 Perfil de Expressão ao Longo do Ciclo Infecioso**

#### 4.4.1.1 Delineamento Experimental

A fim de analisar o perfil de expressão do candidato a efetor PB6584.1 de *P. brachyurus* durante o curso da infecção, foi instalado um experimento em delineamento inteiramente casualizado, composto por 3 repetições biológicas e utilizando a cultivar suscetível à infecção TMG115RR. Os níveis de expressão foram avaliados nos tempos de 12hai, 1, 2, 4, 8, 17 e 35dai. Para a instalação do experimento, as sementes foram germinadas em areia autoclavada, e cinco dias após emergirem, foram transferidas para tubetes contendo areia (1 planta por tubete) e cada planta foi inoculada com 500 indivíduos em volume final de 4 mL (125 indivíduos/mL). O experimento foi conduzido em casa de vegetação do setor de nematologia da Embrapa Soja. O experimento também continha plantas não inoculadas, como controle negativo. O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, macerado e armazenado em ultrafreezer a -80°C.

#### 4.4.1.2 Extração de RNA e Síntese de cDNA

A extração do RNA total de cada amostra (tecido radicular infectado) foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.

Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima Desoxirribonuclease I (Invitrogen - DNase I), com o objetivo de eliminar qualquer molécula de DNA presente. Para isso, 1µg de RNA total de cada amostra foi tratado com 1µL de enzima DNase I [1U/µL], 1µL de tampão de reação (10X DNase I Reaction Buffer) e água DEPC (qsp. 10µL). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, foi adicionado 1µL de EDTA [25mM] seguido de aquecimento a 65°C por 10 minutos, para a inativação da enzima.

As amostras tratadas foram submetidas a reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores para um fragmento do gene  $\beta$ -actina, com o objetivo de verificar contaminações das amostras com DNA genômico de soja. Esse par de primers é complementar a dois exons diferentes, sendo que, na presença de DNA, o produto de amplificação obtido apresenta tamanho de 520pb, enquanto que na presença de apenas cDNA, esse fragmento apresenta tamanho igual a 440pb, visto que um intron de 80pb é retirado após o processamento do RNA mensageiro.

O RNA tratado seguiu para a etapa de síntese de cDNA, utilizando o Kit SuperScript III (Invitrogen). Em microtubos de 0,2mL, foram adicionados 500ng do RNA tratado, 1µL de 50 µM oligo(dT)<sub>20</sub>, 1µL de 10 mM dNTP mix e água DEPC qsp. 10µL. A reação foi incubada em termociclador a 65°C por 10 minutos seguido de 1 minuto no gelo. Em seguida, foram adicionados 2µL de 10X RT buffer, 4µL de MgCl<sub>2</sub>[25 mM], 2µL de DTT [0.1 M], 1µL de inibidor de RNase (RNaseOUT™ [40 U/µL]) e 1µL de enzima transcriptase reversa (SuperScript® III RT [200 U/µL]). Em termociclador (VERITI®96, Applied-Biosystems), a reação foi incubada a 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos para a interrupção da síntese. Por fim, as amostras foram mantidas em gelo para a adição de 1µL de RNase H e incubadas a 37°C por 20 minutos, para a degradação do RNAm utilizado de molde.

As amostras de cDNA foram novamente submetidas a PCR com os primers de β-actina, para verificar possíveis contaminações por DNA.

#### 4.4.1.3 Quantificação da Expressão Gênica por RT-qPCR

As análises do perfil de expressão do gene candidato, ao longo do ciclo infeccioso, foi realizada por RT-qPCR em termociclador 7900 Real Time System (Applied Biosystem), utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen), um fluoróforo intercalante de bases de DNA, onde a intensidade da fluorescência emitida é diretamente proporcional a quantidade de DNA amplificado. Como referência endógena (normalizador), foi utilizado o gene 18S específico para esse nematoide, a fim de se padronizar as quantidades iniciais de cDNA.

Para minimizar erros experimentais, a quantificação relativa para cada gene foi realizada utilizando triplicatas técnicas para cada repetição biológica, em volume final de 12,5µL, sendo 6,25µL de SYBR Green PCR Master Mix 2x contendo Rox, 0,5µL de cada iniciador [10µM] (F e R) (Tabela 3), 4,25 de água ultrapura autoclavada e 1µL de cDNA na diluição 1:10. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada uma curva de desnaturação, que consiste na elevação da temperatura em 1°C/minuto, com o objetivo de verificar se, ao longo da reação, não houve amplificação de produtos inespecíficos, contaminações e formação de dímeros. Isso se justifica pelo fato de que cada molécula de DNA de dupla fita apresenta uma temperatura de

desnaturação específica, sendo possível identificar a amplificação de produtos inespecíficos gerados em uma mesma reação.

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados para análises por RT-qPCR.

Id	Forward	Reverse
18S	CTGTCCGATGCTGCGAGTTT	ACACGACAATACGAGAATGCCC
PB6584.1	GGCTCAATCCATGAAGAAGG	TGCTCGATGCTTGAGATGAC

A eficiência de amplificação de cada par de primers foi estimada utilizando diluições seriadas do cDNA (bulk) (1, 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625). Os valores de Ct obtidos foram plotados em função do logaritmo de cada diluição e o índice de inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação dos primers, a partir da fórmula  $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$ .

Os dados obtidos foram exportados para o programa Microsoft Excel, e utilizados para a quantificação relativa utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  (valores de Ct do candidato normalizado) e posterior construção dos gráficos no software SigmaPlot 13.

#### 4.4.2 Silenciamento gênico do candidato a efetor via Soaking

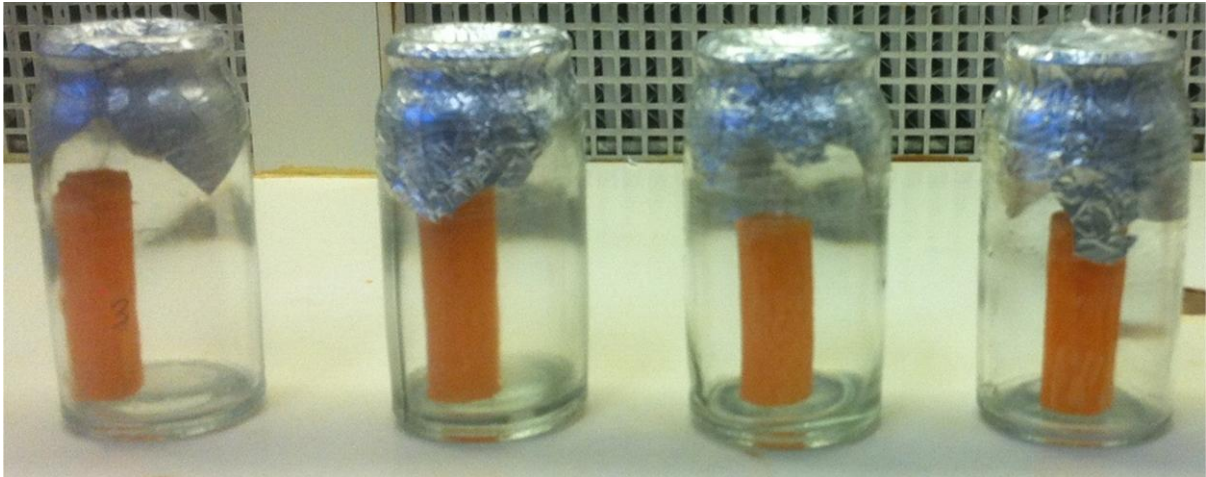
Após confirmada a capacidade de ingestão da solução contendo dsRNA por *P. brachyurus* via soaking, o mesmo procedimento descrito no item 4.3.2 foi realizado onde, após o soaking, os indivíduos foram utilizados para análises *in planta*, a fim de se avaliar o efeito do silenciamento do gene candidato a efetor sobre o potencial de colonização dos nematoides em cilindros de cenoura e em plantas de soja.

##### 4.4.2.1 Bioensaio em cilindros de cenoura

Os cilindros de cenoura foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Moody, Lownsbery e Ahmed (1973) e adaptado por Gonzaga e Santos (2010), onde, as cenouras foram lavadas com esponja e sabão e imersas em hipoclorito de sódio a 0,05% por 30 minutos. Em fluxo laminar, com o auxílio de bisturi flambado, as cenouras foram cortadas em pedaços de 3cm de comprimento, mergulhadas em etanol absoluto (92,8°) e em seguida flambadas.

Com o auxílio de perfurador estéril, os cilindros centrais foram retirados e transferidos para frascos de vidro de 180mL (previamente vedados com papel alumínio e autoclavados) e mantidos em posição vertical por aproximadamente 10 dias (Figura 5).

**Figura 5.** Cilindros de cenoura esterilizados.



Após esse período, os cilindros que não apresentaram contaminação foram inoculados com aproximadamente 80 indivíduos de *P. brachyurus* axenizados/cilindro, conforme descrito por Mountain (1955) com adaptações (GONZAGA e DOS SANTOS, 2010). Os nematoides já alimentados via soaking foram transferidos para microtubos de 1,5mL (80 indivíduos/ tubo), centrifugados por 1000g por 1 minuto e retirado o sobrenadante. Adicionou-se 600µL de ampicilina a 0,1%, seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 1000g por 1 minuto. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 200µL de ampicilina a 0,1%. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Essa última operação foi repetida por mais duas vezes, sendo que na última, adicionou-se 100µL da solução de antibiótico.

Os nematoides foram então inoculados nos cilindros de cenoura (80 indivíduos/ cilindro) em câmara de fluxo laminar, sendo utilizados 8 cilindros para cada dsRNA, incluindo os controles negativos (GFP e ausência de dsRNA). Após 80 dias, foi realizada a extração dos nematoides pela técnica de Coolen e D'herde(1972), conforme descrito no item 4.2. O material obtido foi quantificado em câmara de Peters, utilizando 1mL da suspensão para a projeção do número total de indivíduos e cálculo do fator de reprodução ( $FR= Pf/Pi$ ) (OOSTENBRINK, 1966).

#### 4.4.2.2 Bioensaio em plantas de Soja

Para avaliar o efeito do silenciamento do gene candidato sobre a colonização dos nematoides tratados em solução de Soaking em plantas de soja, foi instalado um experimento em casa de vegetação do setor de Nematologia da Embrapa Soja com delineamento inteiramente casualizado, onde sementes do cultivar suscetível a infecção BRSMG7291PRO foram irrigadas por três dias em vaso contendo areia autoclavada e, cinco dias após emergirem, foram transferidas para tubetes contendo areia (1 planta por tubete). Após dois dias, cada planta foi inoculada com 300 indivíduos em volume final de 4 mL (75 indivíduos/mL).

Foram utilizadas 10 plantas para cada dsRNA, incluindo os controles negativos (GFP e ausência de dsRNA). Após 60 dias, foi realizada a extração dos nematoides pela técnica de Coolen e D'herde (1972), conforme descrito no item 4.2 para a estimativa do número total de indivíduos e cálculo do fator de reprodução ( $FR = Pf/Pi$ ) (OOSTENBRINK, 1966).

Em paralelo, para se avaliar o silenciamento do candidato, foram realizadas análises de expressão gênica do candidato conforme itens 4.4.1.2 e 4.4.1.3 pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), utilizando como calibrador amostras das plantas tratadas com dsRNA-GFP. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software SigmaPlot 13.

#### 4.4.3 Silenciamento gênico do candidato a efetor via Aplicação Ectópica na Raíz

Após a confirmação da viabilidade dessa metodologia, foi avaliado o efeito do silenciamento do gene candidato sobre a colonização dos nematoides em plantas de soja. Para isso, foi instalado um experimento em casa de vegetação do setor de Nematologia da Embrapa Soja com delineamento inteiramente casualizado, onde sementes da cultivar suscetível a infecção BRSMG7291PRO foram irrigadas por três dias em vaso contendo areia autoclavada e, cinco dias após emergirem, foram transferidas para tubetes contendo areia (1 planta por tubete). Em seguida, o fornecimento de água foi suspenso por dois dias, até a secagem e, após esse período, 10µg de dsRNA (volume final de 2 mL) foram aplicados diretamente na raiz com auxílio de micropipeta. Após 12 horas, cada planta foi inoculada com 500

indivíduos em volume final de 4 mL (125 indivíduos/mL).

Foram utilizadas 10 plantas para cada dsRNA, incluindo os controles negativos (GFP e ausência de dsRNA). Após 60 dias, foi realizada a extração dos nematoides pela técnica de Coolen e D'herde(1972), conforme descrito no item 4.2 para a estimativa do número total de indivíduos e cálculo do fator de reprodução ( $FR=Pf/Pi$ ) (OOSTENBRINK, 1966).

Em paralelo, para se avaliar se o silenciamento do candidato, foram realizadas análises de expressão gênica do candidato conforme itens 4.4.1.2 e 4.4.1.3 pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), utilizando como calibrador amostras das plantas tratadas com dsRNA-GFP. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software SigmaPlot 13.

#### 4.4.4 Análise estatística

A fim de se comparar as plantas expostas ao dsRNA do candidato em relação ao controle (dsRNA-GFP), analisando o fator de reprodução e o número total de indivíduos, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ao nível de 5% de significância através do software SAS.

Para as análises estatísticas dos dados de expressão gênica obtidos a partir da quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , foi aplicado o teste T ao nível de 5% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

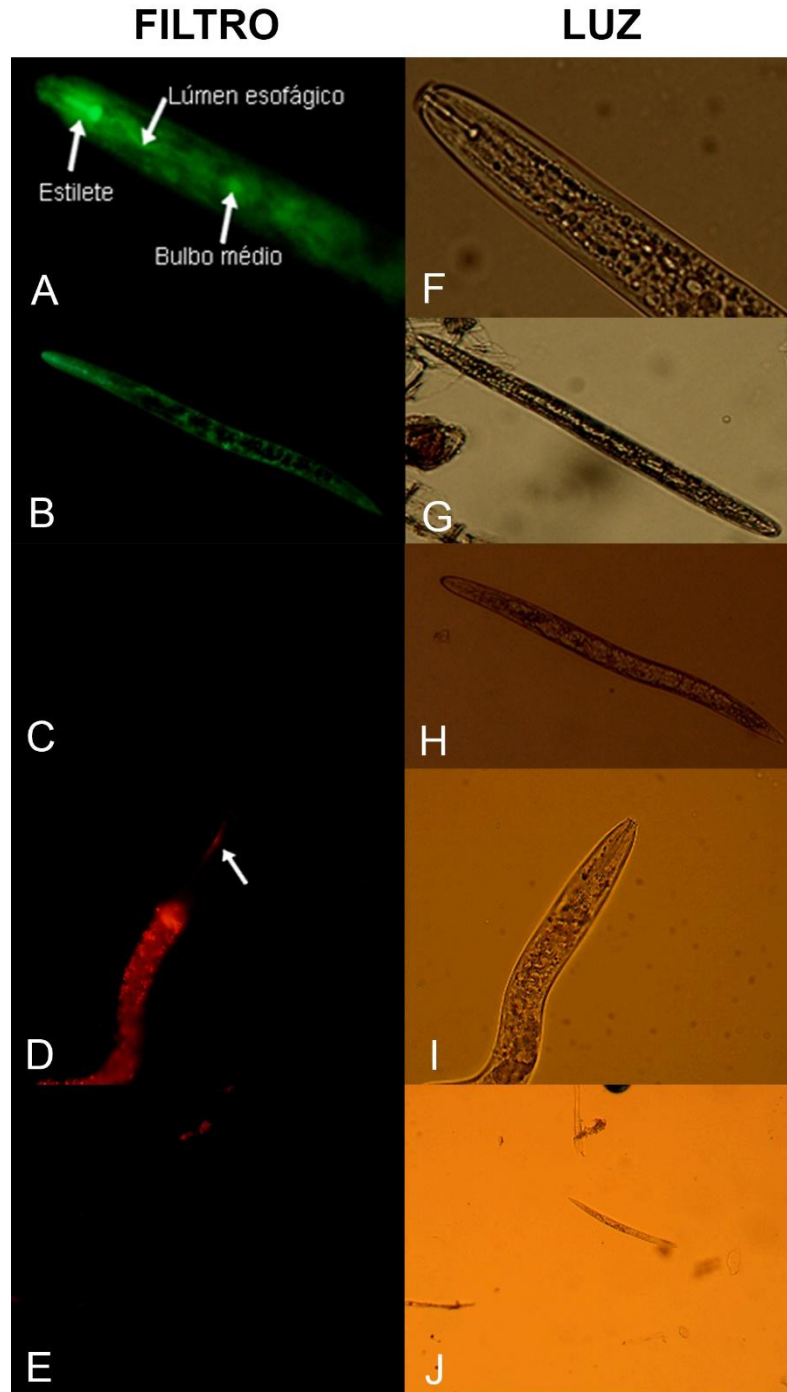
### 5.1 Padronização de metodologias para estudo funcional de genes de *P. brachyurus* via PTGS

#### 5.1.1 Ensaio de Fornecimento de dsRNA via Soaking

Para estabelecer uma metodologia de validação funcional de genes via aplicação de dsRNA em *P. brachyurus*, a metodologia descrita por Tabara, Grishok e Mello (1998) e adaptada por Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013) para este mesmo gênero de fitonematoides foi adotada, selecionando os melhores critérios definidos no trabalho.

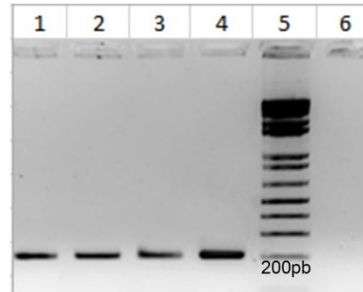
Após 16 horas de incubação dos nematoides em tampão M9, dsRNA, octopamina e FITC, foi possível detectar os sinais de fluorescência no estilete e glândulas esofágicas, indicando que estes são capazes de ingerir a solução de soaking via estilete. Adicionalmente, para confirmar a entrada do dsRNA, moléculas de dsRNA marcadas covalentemente com Cy3 foram utilizadas, sendo também possível detectar sinais de fluorescência na glândula esofágica, indicando efetivamente a ingestão da molécula de dsRNA (Figura 6).

**Figura 6.** Microscopia de fluorescência de juvenil (J2) de *P. brachyuruse* em solução de soaking + dsRNA de GFP (2mg/mL) após 16h de incubação. A, B, F e G: Com acréscimo de FITC (1mg/mL). C e H: Sem FITC. D, E, I e J: dsRNA marcado com Cy3.



As análises moleculares, via PCR com os iniciadores F2/R2 que amplificam especificamente o fragmento do gene GFP, também demonstram a presença do dsRNA-GFP no tecido dos nematoides tratados em solução de soaking, corroborando os resultados da microscopia de fluorescência (Figura 7).

**Figura7.** Produto de amplificação do fragmento correspondente ao dsRNA de GFP no tecido dos nematoides tratados em solução de soaking. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da reação de PCR (primers F2/R2) (Amplicon de 206pb). 1, 2 e 3: RNA dos nematoides; 4: Controle positivo; 5: Marcador de peso molecular 1Kb plus; e 6: Controle negativo.



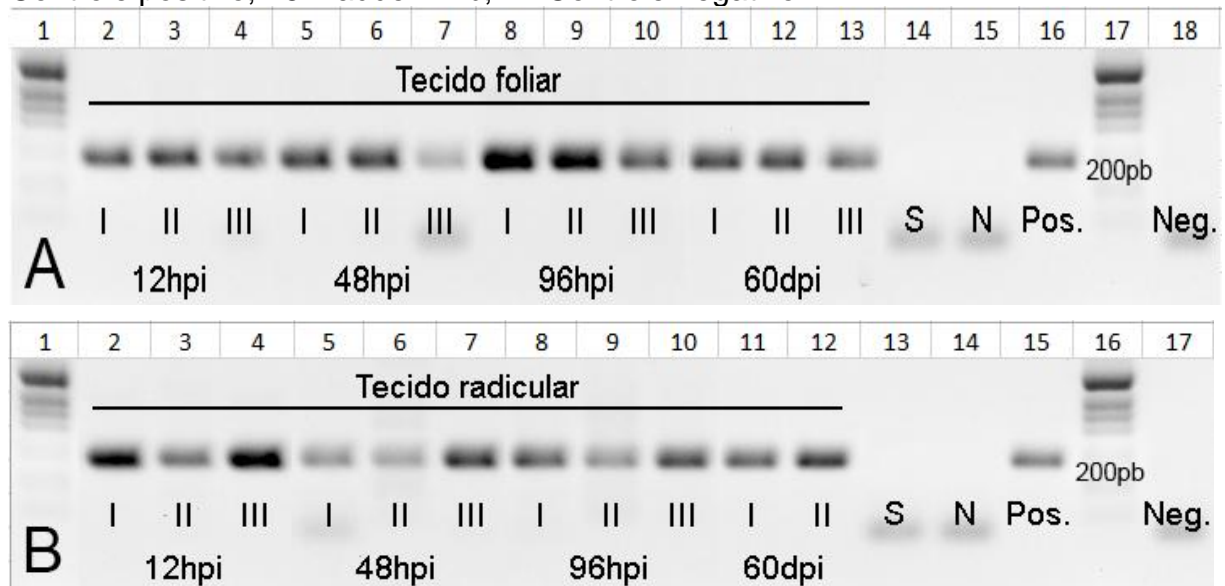
### 5.1.2. Ensaio de fornecimento de dsRNA via Aplicação Ectópica na Raíz

Os resultados do ensaio de fornecimento de dsRNA via aplicação ectópica na raiz demonstraram a presença do dsRNA-GFP nos tecidos foliares e radicular das plantas de soja, mesmo após 60 dias de inoculação do mesmo (Figura 8). É provável que a suspensão da irrigação das plantas, dois dias antes da inoculação do dsRNA, tenha permitido uma melhor e maior absorção da solução pelas raízes e também seu transporte, via xilema, para a parte aérea.

Em alguns organismos, como *C. elegans*, o mecanismo de silenciamento gênico possui caráter sistêmico, podendo ser induzido em uma célula e transmitida para tecidos adjacentes (FIRE *et al.*, 1998). Nesses nematoides, isso ocorre através das proteínas transmembrana denominadas SID-1 e SID-2 (WINSTON, MOLODOWITCH e HUNTER, 2002; WINSTON *et al.*, 2007). Também em *C. elegans*, esse sinal de silenciamento pode ainda ser transmitido aos descendentes, através de células germinativas, perdurando por várias gerações (GRISHOK, TABARA e MELLO, 2000). Além disso, a permanência do dsRNA nos tecidos da planta por longo período pode ser um indício de que essa molécula possa estar sendo replicada pela própria maquinaria celular de silenciamento pós transcricional. Esse fenômeno, já descrito em plantas e nematoides (BERNSTEIN, DENLI e HANNON, 2001; DALMAY *et al.*, 2001; SIJEN *et al.*, 2001), consiste na ação de uma RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP), que pode amplificar o silenciamento através da geração de novas moléculas de dsRNA utilizando como molde os siRNAs, resultantes após o processamento do dsRNA pela maquinaria de

silenciamento pós transcricional (WATSON *et al.*, 2015).

**Figura 8.** Detecção e estabilidade de dsRNA-GFP nos tecidos foliar e radicular de soja. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da reação de PCR (primers F2/R2). (A) Amostras de RNA do tecido foliar. 1: Ladder 1Kb; 2, 3 e 4: 12hai; 5, 6 e 7: 48hpi; 8, 9 e 10: 96hai; 11, 12 e 13: 60dai. 14: cDNA de soja; 15: cDNA de *P. brachyurus*; 16: Controle positivo; 17: Ladder 1Kb; 18 Controle negativo.(B) Amostras de RNA do tecido radicular. 1: Ladder 1Kb; 2, 3 e 4: 12hpi; 5, 6 e 7: 48hpi; 8, 9 e 10: 96hpi; 11, 12: 60dai. 13: cDNA de soja; 14: cDNA de *P. brachyurus*; 15: Controle positivo; 16: Ladder 1Kb; 17 Controle negativo.



Esses resultados demonstram que a AE do dsRNA para o controle de nematoides constitui uma técnica promissora para o estudo da função de genes, bem como possíveis aplicações futuras para seu controle, visto que a permanência das moléculas e possível amplificação do sinal pode abranger todo o ciclo de vida do patógeno, que varia de 30 a 40 dias (HUANG *et al.*, 2006; GOULART, 2008). Resultados semelhantes já foram descritos por Hunter e colaboradores (2012), que confirmaram a absorção radicular de dsRNA em citrus, sendo detectável após 7 semanas de inoculação (2g de dsRNA em solução com volume final de 15 litros). Foi demonstrado ainda que insetos que se alimentaram das plantas tratadas também foram capazes de absorver o dsRNA exógeno, indicando que o dsRNA absorvido por via radicular, foi disseminado para outras partes da planta via xilema e foi capaz de ser assimilado pelo inseto.

Li e colaboradores (2015) também demonstraram a absorção radicular de dsRNA em experimentos com cigarrinha marrom (*Nilaparvata lugens*)

em arroz, onde o tecido radicular foi imerso em solução contendo dsRNA (1mg/mL) de EYFP (controle exógeno marcado com uma molécula fluorescente repórter de ingestão). Em seguida, os insetos foram alimentados com essas plantas tratadas com dsRNA. Em microscópio de fluorescência, foi observada fluorescência na bainha e haste da planta, assim como nos insetos. Quando o experimento foi realizado utilizando dsRNA similar ao gene do inseto (carboxylesterase - *Ces*), foi observada uma mortalidade próxima de 50% após 5 dias de alimentação na planta tratada com dsRNA. Os dados apresentados reforçam a possibilidade de aplicação dessa metodologia em estudos envolvendo fitonematoides.

As diferenças entre as concentrações de dsRNA necessárias para a indução de silenciamento nos diferentes sistemas já testados podem ser resultado tanto da sensibilidade ao RNAi, como nas diferenças estruturais entre diferentes organismos (TERENIUS *et al.*, 2011), o que pode favorecer o acúmulo ou dispersão do dsRNA, indicando que essas quantidades devem ser padronizadas para cada organismo, a fim de se obter uma concentração ótima para a indução do silenciamento (SHAKESBY *et al.*, 2009).

Hunter e colaboradores (2012) sugerem ainda a utilização dessa técnica em larga escala para o controle de pragas e patógenos. Entretanto, ainda é cedo para afirmar se essa possibilidade é real, pois seriam necessárias altas concentrações de dsRNA. Outro fator importante é a estabilidade das moléculas de dsRNA no solo. Li e colaboradores (2015) observaram uma alta estabilidade do dsRNA, mesmo em temperaturas acima de 60°C ou sob contínua exposição a radiação ultravioleta. Em nosso estudo, as moléculas de dsRNA apresentaram-se estáveis até o último tempo avaliado, 60dai.

Apesar das barreiras frente a sua utilização em larga escala, essa metodologia apresenta potencial para ser empregada em estudos envolvendo o screening de possíveis alvos que possam vir a sofrer interferência, pois se trata de uma técnica menos onerosa quando comparada, por exemplo, com a metodologia de soaking, que, necessita de etapas de incubação e lavagem, além de substâncias auxiliares (meio de incubação, neuroestimulantes) e altas concentrações de dsRNA.

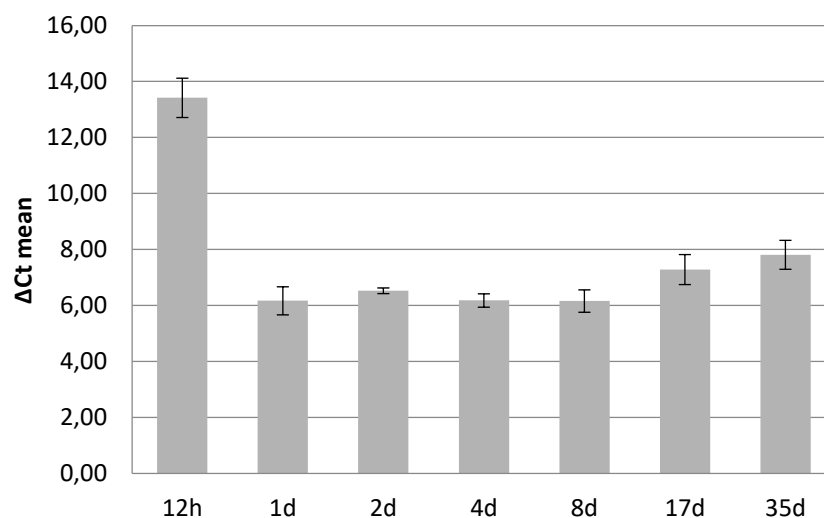
## 5.2 Caracterização funcional do gene candidato a efetor de *P. brachyurus* PB6584.1

5.2.1. A ativação do gene PB6584.1 ocorre quando em primeiro contato com a planta

A análise de eficiência dos iniciadores para detecção do gene alvo PB6584.1, bem como do controle endógeno rRNA 18S do nematoide, apresentaram valores de 94,2 e 99,4%, respectivamente, com curvas de dissociação apresentando apenas um pico bem definido.

Os resultados das análises de expressão do gene PB6584.1 revelaram a ativação da transcrição do efetor em já em 12h após o contato com o hospedeiro, com grande aumento na expressão em 1d, se mantendo na mesma faixa de expressão até 8d, com sutil redução em 17 e 35d. Esses resultados sugerem uma possível participação deste gene no estabelecimento do parasitismo, que ocorre nas primeiras 24 horas após a infecção, para nematoides migradores (OYEKAN, BLAKE e MITCHELL, 1972).

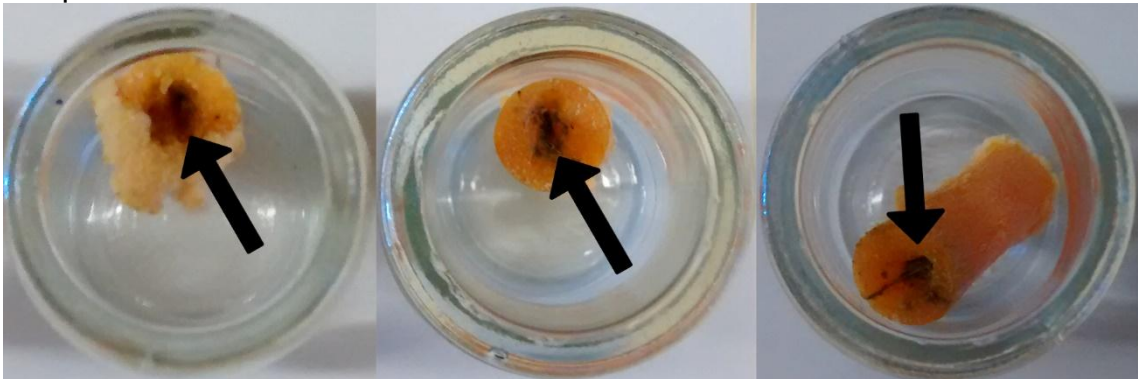
**Gráfico 1.** Perfil de expressão do candidato PB6584.1 ao longo do ciclo infeccioso, utilizando os valores de média de  $\Delta Ct$ .



### 5.2.2. Silenciamento do gene PB6584.1 em Cilindros de Cenoura

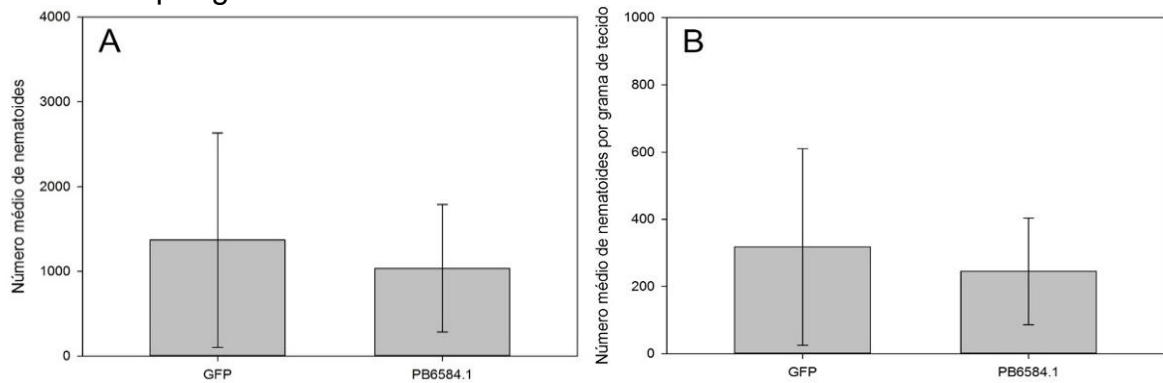
Os resultados do bioensaio em cenoura demonstraram que após 60 dai a presença de manchas necróticas escurecidas no topo dos cilindros, no local da inoculação, confirmando a infecção e estabelecimento da população de *P. brachyurus* (Figura 9). Também foi possível observar as alterações de intensidade da lesão necrótica com o decorrer do tempo, sendo proporcional ao aumento da população de nematoides (MOODY, LOWNSBERY e AHMED, 1973; GONZAGA e DOS SANTOS, 2010).

**Figura 9.** Sintomas indicativos do estabelecimento e multiplicação de *P. brachyurus* nos cilindros de cenoura, com lesão inicial sobre o ponto de inoculação, visualizado após aproximadamente 60 dai.



Após 80dai, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (dsRNA-GFP e PB6584.1), tanto em relação ao número médio de nematoides por cilindro, como quando se estima o número médio de nematoides por grama de tecido ( $p>0.05$ ). Os resultados se mantiveram mesmo quando as amostras foram consideradas individualmente, em cada repetição. Resultado similar também foi observado com a análise do parâmetro fator de reprodução (FR), variando entre 2,5 e 44,8. Em experimentos de fenotipagem de plantas para a resistência/sucetibilidade ao nematoide de lesão radicular, normalmente aplica-se um corte máximo de  $FR<1$  para classificação de plantas resistentes (OOSTENBRINK, 1966).

**Gráfico 2.** Resultado da contagem do número de indivíduos de *P. brachyurus* tratados com dsRNA para o silenciamento do gene PB6584.1 em cilindros de cenoura . (A) Número médio de nematoides por cilindro; (B) Número médio de nematoides por grama de tecido.



Dentre as diferentes funções atribuídas aos genes da família 14-3-3, destaca-se sua participação na regulação do ciclo celular (MITCHUM *et al.*, 2007), transcrição, metabolismo primário, resposta de defesa (SILES-LUCAS *et al.*, 2003; BERG e TAYLOR, 2008), distribuição intracelular de proteínas, transdução do sinal hormonal (JONES, GHEYSEN e FENOLL, 2011); e ainda mediando interações proteína-proteína (DAVIS, HUSSEY e BAUM, 2009; HASSAN, BEHM e MATHESIUS, 2010; LIU, CHEN e DUAN, 2011), o que sugere seu envolvimento na comunicação planta-nematoide (JAUBERT *et al.*, 2004). Desse modo, uma possível explicação para o fato do silenciamento do gene não ter ocasionado efeito direto na multiplicação do nematóide pode ser o comprometimento desta comunicação quando do cultivo *in vitro*, visto que após todo o processamento realizado, os cilindros de cenoura funcionam basicamente como um meio de cultura para os nematoides. A necessidade da interação com o hospedeiro para a ativação da expressão do gene no nematoide pode ser observada no Gráfico 1. Dessa forma, o silenciamento de PB6584.1 não implicaria em alterações fenotípicas, visto que essa proteína não se faria necessária ao estabelecimento do parasitismo ou mesmo nem seria expressa na situação *in vitro*. A determinação dos níveis de expressão do gene PB6584.1 em nematoides, na ausência do hospedeiro, serão cruciais para confirmar tal hipótese. Adicionalmente, a confirmação do silenciamento do gene nos tecidos do nematóide logo após o soaking serão fundamentais para determinar a eficiência de silenciamento genico em *P. brachyurus* por esta metodologia e inferir sobre o possível

papel do candidato a efetor na interação inicial com o hospedeiro, e a necessidade desse para sua ativação.

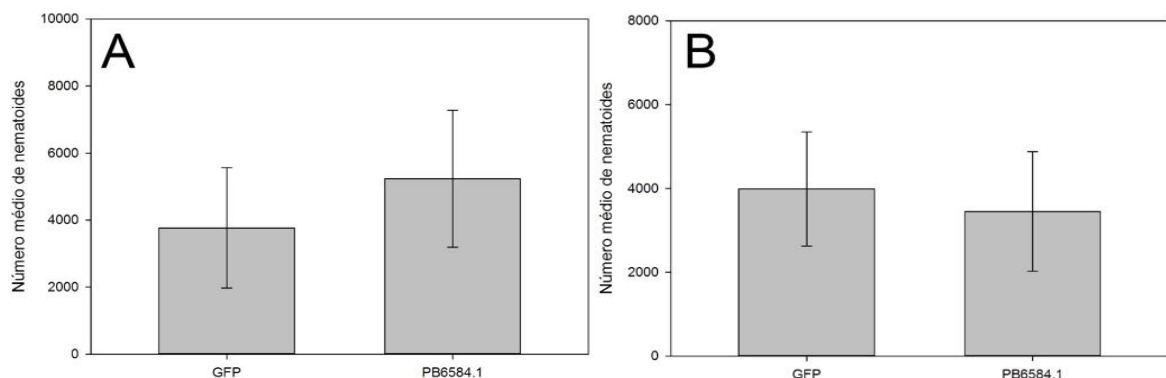
Ainda, foi observada uma elevada heterogeneidade entre as repetições do experimento, que pode ser uma consequência da diferença na composição química e tempo de vida entre os cilindros de cenoura, que poderia torná-las mais ou menos favoráveis a multiplicação dos nematoides.

### 5.2.3 Silenciamento do gene PB6584.1 em plantas de Soja infectadas

As metodologias de soaking e AE foram também utilizadas para o estudo da função do gene PB6584.4. Os parâmetros FR e número médio de nematoides foram determinados em plantas de soja inoculadas com os nematoides que tiveram contato com o dsRNA via soaking e via aplicação direta da molécula na raiz (10 repetições biológicas).

Após 60 dai, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (dsRNA-PB6584.1 e GFP) ( $p > 0,05$ ) em relação ao número de indivíduos totais, tanto no experimento de Soaking como no de AE. Mesmo quando se considerou o número de indivíduos corrigido pela massa de raiz, ainda não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos (Gráfico 3).

**Gráfico 3.** Resultado da contagem do número médio de indivíduos de *P. brachyurus* tratados com dsRNA para o silenciamento do gene PB6584.1 em plantas de soja. Método de entrega: (A) Soaking; (B) Aplicação ectópica.

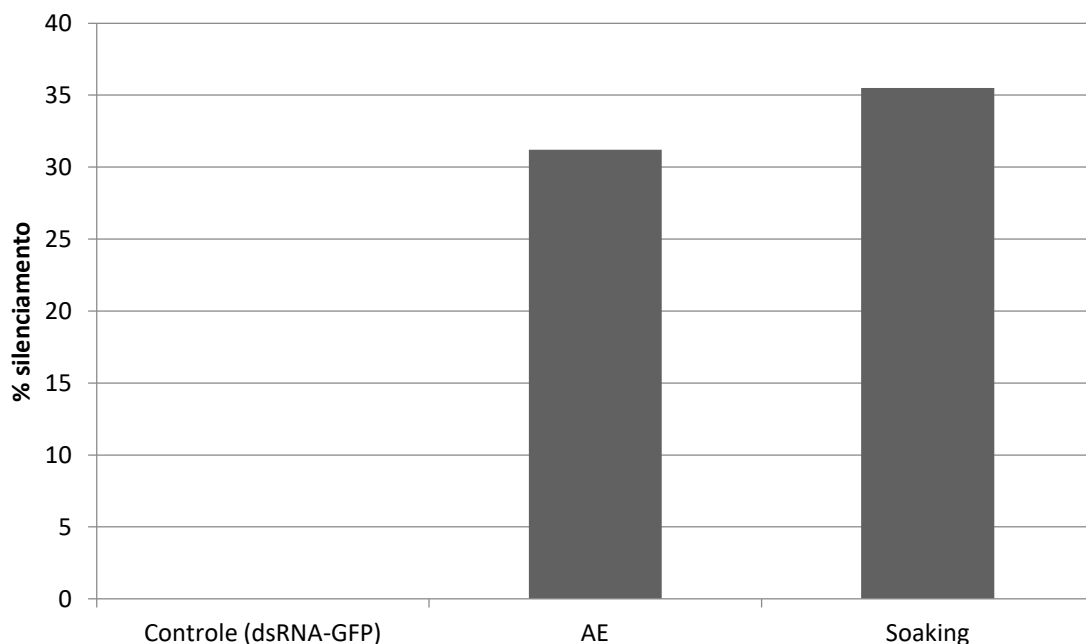


Os valores referentes ao fator de reprodução (FR) observados variaram entre 8,5 e 28,5 nos ensaios via Soaking, e 2,36 e 11,64 para o ensaio com Aplicação Ectópica. Foi observada elevada diferença entre cada repetição biológica,

levando a altos valores de desvio, não sendo possível observar uma diferença significativa entre os tratamentos.

Para se confirmar a ocorrência de silenciamento gênico, uma amostra média, contendo tecidos das raízes de cada uma das plantas foi avaliada. Quando se considerou a média dos valores de expressão gênica do gene alvo, também foi observada diferença significativa entre os tratamentos (dsRNA-PB6584.1 e GFP) ( $p < 0,05$ ), indicando que o dsRNA do gene alvo, tanto no experimento de Soaking como no de Aplicação Ectópica, foi capaz de induzir o silenciamento do gene candidato.

**Gráfico 4.** Valores de porcentagem (%) de silenciamento médio, resultantes da análise de expressão relativa por RT-qPCR do gene candidato PB6584.1 após 60dai. (S) Soaking; (AE) Aplicação ectópica.

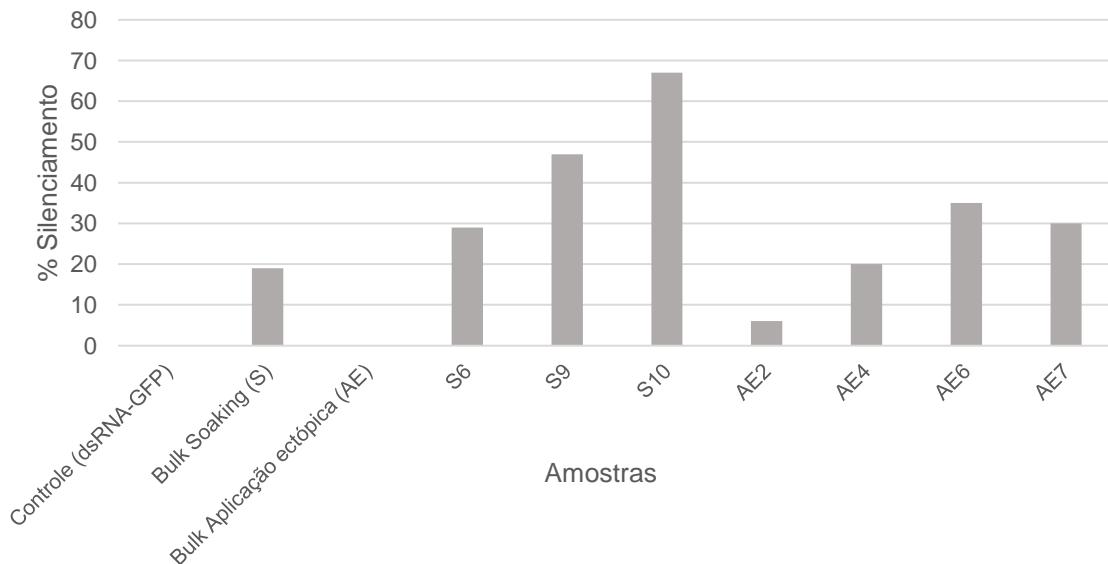


No entanto, para se avaliar a possibilidade de ocorrência de silenciamento a nível de planta individual, que poderia estar sendo ocultado quando as plantas foram avaliadas conjuntamente, os níveis de expressão de pelo menos 2 indivíduos, apresentando maiores e menores níveis de FR (Tabela 4), foram quantificados via RT-qPCR para ambos os experimentos. No experimento de soaking, foi observada uma relação inversa e esperada entre os níveis de silenciamento e os parâmetros avaliados. As amostras S9 e S10, que tiveram os

maiores níveis de silenciamento (>45%), foram as que apresentaram os menores valores de FR e número de indivíduos. De modo similar, a amostra S6 apresentou o menor nível de silenciamento (<30%) e, por conseguinte, teve o maior nível de infecção (Gráfico 4).

No caso do experimento via AE, nenhuma das 4 amostras avaliadas individualmente, apresentou níveis de silenciamento gênico acima de 35% (Gráfico 4/ Tabela 4).

**Gráfico 5.** Valores de porcentagem (%) de silenciamento resultantes da análise de expressão relativa por RT-qPCR do gene candidato PB6584.1 após 60dai. (S) Soaking; (AE) Aplicação ectópica.



Quando se avalia o efeito do silenciamento em plantas individuais, percebe-se que o silenciamento gênico apresenta grande variação entre as repetições biológicas, em ambos os experimentos, variando de 29% a 67% no Soaking e 6% a 35% na AE, considerando o total de 3 e 4 plantas avaliadas em cada tipo de metodologia, respectivamente.

Aparentemente, a metodologia de Soaking apresentou melhores níveis de silenciamento e maior concordância entre os níveis de silenciamento e consequente redução na patogenicidade. Essa forma de administração do dsRNA, embora mais onerosa, onde os nematoides ficam em contato direto com as moléculas de dsRNA, parece favorecer o silenciamento.

Já na técnica de AE, a transferência das moléculas de dsRNA e/ou siRNA pode depender do processamento dos dsRNAs pela maquinaria da planta hospedeira e da habilidade do patógeno em absorver e assimilar tais moléculas durante a infecção. Até o momento, nenhum trabalho demonstrou a capacidade de *P. brachyurus* em absorver moléculas de dsRNA quando as mesmas tenham sido administradas via AE. Análises futuras serão importantes para demonstrar tal capacidade.

Adicionalmente, a eficiência do silenciamento induzido por dsRNAs pode ser influenciada por diferentes fatores. Uma outra possível explicação para estes resultados pode ser que as quantidades de dsRNA utilizadas tenham sido insuficientes. No experimento de Soaking, onde se obteve os melhores níveis de silenciamento, foram utilizados os melhores parâmetros obtidos por Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013), que avaliaram diferentes condições (concentração de dsRNA, neuroestimulantes e substâncias auxiliares, tempo de incubação e temperatura) e obtiveram os melhores níveis de silenciamento de genes em outras espécies de *Pratylenchus* spp utilizando 2mg/mL de dsRNA. Já no experimento de AE, foi utilizada uma quantidade de dsRNA similar as descritas em experimentos com insetos (10µg). Por se tratar de uma metodologia que ainda não foi descrita em estudos envolvendo *P. brachyurus* ou outros fitonematoides, até o momento não há uma quantidade ideal descrita. Dessa forma, novos ensaios se fazem necessários para se estabelecer uma relação entre a quantidade de dsRNA utilizado e a resposta de silenciamento no organismo alvo.

Além da quantidade de dsRNA, o tamanho do alvo também deve ser considerado. Embora já tenha sido demonstrado silenciamento utilizando dsRNAs com tamanhos desde <30pb (XIA *et al.*, 2002) a >1800pb (HUVENNE e SMAGGHE, 2010), não há um consenso em relação ao tamanho a ser utilizado. Apesar disso, diversos autores sugerem que moléculas com tamanhos variando entre 140 e 520pb seja as ideais (LINZ *et al.*, 2013; ANDRADE e HUNTER, 2016), pois possibilitam que uma região menor seja alvo de um número maior de siRNAs quando comparado a dsRNAs longos (>1000pb). Além disso, um maior número de siRNAs gerados reduz a ocorrência de resistência ocasionada pela variação genética entre os indivíduos (ANDRADE e HUNTER, 2016). Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013) observaram redução superior a 70% na reprodução de *P. thornei* em cilindros de cenoura utilizando dsRNAs correspondentes a genes essenciais para a contração muscular e

locomoção (*pat-10* e *unc-87*) com sequências-alvo de 372 e 159pb, respectivamente.

Outro importante fator é o mRNA alvo do silenciamento (FAR e SCZAKIEL, 2003). Mesmo não havendo dados sobre uma região alvo ideal, a presença de estruturas secundárias no mRNA pode alterar a eficiência do silenciamento. Gredell, Berger e Walton (2008) observaram uma maior redução na expressão de genes alvo utilizando dsRNAs complementares as extremidades 5' e 3' não pareadas quando comparados a regiões com estruturas secundárias preditas. Isso deixa clara a necessidade de se avaliar dsRNAs correspondentes a diferentes regiões do mRNA.

No caso do candidato PB6584.1, foi utilizado um dsRNA com tamanho de 156 pb. Devido a elevada similaridade do gene em diferentes espécies, incluindo a soja, contendo regiões altamente conservadas entre espécies, não foi possível um desenho maior que 156 pb, pois possibilitaria a ocorrência de efeitos em genes não alvo.

Adicionalmente, os níveis de expressão do mRNA alvo também pode influenciar o silenciamento. Hu e colaboradores (2004) demonstraram que transcritos com baixa expressão são menos suscetíveis a degradação mediada por siRNAs e, conseqüentemente, menores serão os níveis de silenciamento detectados.

Os dados apresentados sugerem a necessidade de se realizar experimentos de otimização das metodologias, a fim de se avaliar a influência desses fatores sobre o silenciamento do gene alvo e assim determinar o exato papel dessa proteína na interação planta-nematoide.

**Tabela 4.** Valores de nematoides por planta, fator de reprodução e nível de expressão do gene PB6584.1 60dai.

Amostra	Soaking						Aplicação Ectópica					
	Nematoides/ Planta		FR		% Silenciamento		Nematoides/ Planta		FR		% Silenciamento	
	GFP	PB6584.1	GFP	PB6584.1	Bulk	Individual	GFP	PB6584.1	GFP	PB6584.1	Bulk	Individual
<b>1</b>	5380	6000	17,9	20,0	19%	-	-	4040	-	8,08	0%	-
<b>2</b>	3240	3980	10,8	13,3		-	-	2260	20,32	4,52		6%
<b>3</b>	-	6100	-	20,3		-	3280	3120	6,56	6,24		-
<b>4</b>	3020	7860	10,1	26,2		-	4100	5820	8,20	11,64		20%
<b>5</b>	1440	3680	4,8	12,3		-	2860	3440	5,72	6,88		-
<b>6</b>	-	8560	-	28,5		29%	-	1180	-	2,36		35%
<b>7</b>	4960	6120	16,5	20,4		-	3880	4680	7,76	9,36		30%
<b>8</b>	1560	4660	5,2	15,5		-	2640	3060	5,28	6,12		-
<b>9</b>	6480	2800	21,6	9,3		47%	4480	-	8,96	-		-
<b>10</b>	4040	2560	13,5	8,5		67%	6680	-	13,36	-		-
<b>Média</b>	3765	5232	12,55	17,44	-	-	3988,6	3450	9,52	6,90	-	-
<b>DP</b>	1796,08	1738,67	5,978	6,398	-	-	1360,38	1429,68	5,038	2,859	-	-

FR: Fator de reprodução

DP: Desvio padrão

## 6 CONCLUSÕES

O gene PB6584.1 é ativado no início da infecção, o que sugere uma possível participação deste gene no estabelecimento do parasitismo do nematoide para com o hospedeiro.

Através da microscopia de fluorescência, foi possível confirmar que o nematoide foi capaz de ingerir moléculas de dsRNA, sendo possível detectar os sinais de fluorescência no estilete e glândulas esofágicas.

O bioensaio com cilindros de cenoura não foi um bom sistema para estudo funcional de genes que dependam da interação com o hospedeiro.

O ensaio de fornecimento de dsRNA, via aplicação ectópica na raiz, confirmou que dsRNA-GFP foi absorvido por via radicular e translocado para a parte aérea, se mantendo detectável mesmo após 60 dias de inoculação.

A metodologia de aplicação ectópica de dsRNA em raízes de soja se mostrou promissora para o estudo funcional de genes em fitonematóides.

A metodologia de soaking seguida da inoculação dos nematoides tratados nas raízes de soja resultou em melhores níveis de silenciamento e efeito sobre o gene alvo.

## 7 Artigo: RNAi APPROACH FOR GENE FUNCTION STUDIES IN ROOT-LESION NEMATODE *Pratylenchus brachyurus*

Rafael B. Guayato Nomura; Valéria S. Lopes-Caitar; Suellen Mika Hishinuma Silva; Ivani de Oliveira Negrão Lopes; Waldir Pereira Dias; Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães

### Resumo

*Pratylenchus brachyurus* é o Segundo principal fitonematoide no Brasil, infectando a soja e outras culturas economicamente importantes. Considerando que as atuais práticas agronômicas para o controle deste patógeno tem alcançado êxito, o desenvolvimento de variedades resistentes constitui uma alternativa promissora. Até o momento, vários genes de parasitismo têm sido descritos e caracterizados em diferentes espécies. Entretanto, os poucos trabalhos em *P. brachyurus* tem dificultado a atribuição de seu exato papel no seu parasitismo. Atualmente, o mecanismo de RNAi tem sido considerado uma poderosa ferramenta para a elucidação da função de genes na interação planta-patógeno. Tradicionalmente, estudos envolvendo RNAi em fitonematoídes são conduzidos tanto *in vitro* (incubando os nematoídes em solução contendo dsRNA na presença de um neuroestimulante) e *in planta* (através de plantas geneticamente modificadas expressando dsRNAs). Recentemente, a entrega de dsRNA *in planta* sem a necessidade de modificações genéticas, conhecida como Aplicação Ectópica (AE) de dsRNAs tem sido utilizada em diferentes espécies de pragas e fitopatógenos. Essa metodologia se baseia na absorção radicular de dsRNA e, até o momento, não há descrição da aplicação dessa metodologia em estudos envolvendo fitonematoídes. Alguns trabalhos envolvendo insetos demonstraram que os mesmos foram capazes de absorver o dsRNA administrado por via radicular resultando em silenciamento gênico. Isso deixa claro o potencial dessa metodologia para aplicação em outros organismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade das metodologias baseadas na utilização de dsRNA exógeno para o estudo funcional de genes em *P. brachyurus*. Para isso, foram utilizadas moléculas de dsRNA-GFP não complementares aos transcritos do nematoíde. Inicialmente, a metodologia de Soaking foi avaliada, onde, indivíduos de *P. brachyurus* foram incubados em solução de Soaking na presença do neuroestimulante octopamina e marcadores fluorescentes de ingestão (FITC e Cy-3-dsRNA). Após a incubação, sinais de fluorescência foram detectados tanto no estilete como na glândula esofágica indicando que os nematoídes foram capazes de ingerir o dsRNA. Também foi realizada a Aplicação Ectópica de dsRNA em plantas de soja. Foram avaliados tanto o transporte do dsRNA no tecido vegetal, como a sua estabilidade ao longo do tempo, sendo possível detectar o dsRNA mesmo após 60dai. Também foi confirmada a ocorrência de silenciamento gênico específico em *P. brachyurus*, para ambos os métodos. Esses resultados demonstraram o potencial de ambos os métodos para estudos de caracterização funcional de genes em *P. brachyurus*.

**Abstract**

*Pratylenchus brachyurus* is the second most important plant parasitic nematode (PPN) in Brazil, which infects soybean and other economically important crops. As the current agronomic practices to control this pathogen have been shown unsuccessful and not worth, the development of resistant varieties is a promising alternative. So far, many nematode parasitism genes have been described and characterized among different species. However, the few data about these genes in *P. brachyurus* have made it difficult to identify their role in plant parasitism. Nowadays, RNAi has been considered a powerful reverse genetic approach for gene functional elucidation in plant pathogen interaction. Traditionally RNAi-based studies in PPNs are performed by both, *in vitro* (by soaking the nematodes in a dsRNA solution with a neurostimulant combination) and *in planta* (by genetic modified plants expressing dsRNA molecules) approaches. Recently, non-transgenic dsRNA delivery, *in planta*, known as Ectopic Delivery (ED) of dsRNA molecules, has been applied for many different plant pathogen and pests. The methodology is based on the root absorption of the dsRNA and no data about its application in PPNs studies is available. Studies involving ED in insects shows that they were able to up take the root absorbed dsRNA by feeding and have their target gene silenced. It makes clear the potential of the method for application in other organisms. The aim of this study was to evaluate the viability of non-transgenic dsRNA plant-ectopic delivery methods for gene function studies in *P. brachyurus*. For this purpose, non-target dsRNA-GFP was applied as control molecule. Initially soaking was performed where *P. brachyurus* mixed stages were incubated in a basic soaking solution in the presence of neurostimulant octopamine and fluorescent ingestion markers (FITC and Cy -3 labeled dsRNA). After incubation, fluorescence was observed in both stylet and esophageal glands, indicating that the soaked nematodes ingested the dsRNA. For *in planta* ectopic delivery, dsRNA root absorption was performed in soybean plants. We evaluated the transport of dsRNA through the plant tissues as well as its stability over the time. The dsRNA was detected 60dpi. We also confirmed the occurrence of a specific *P. brachyurus* gene silencing for both delivery methods. These results demonstrate the potential of both methods for gene functional characterization studies in *P. brachyurus*.

## Introduction

*Pratylenchus brachyurus* is a widely spread migratory endoparasitic nematode (SILVA *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007; UEBEL *et al.*, 2014), being both male and female able to penetrate the host through or within cortical parenchymal cells of root tissues. In the parenchyma, these organisms feed on the cellular content, causing lesions, disorganizing and destroying the cells at the site of their penetration and movement (FONSECA, 2012), and thus making the plant more susceptible to secondary fungal and bacterial infections (GOULART, 2008).

Because it is a biotrophic pathogen, the success of its parasitism is dependent on its ability to establish a relationship with the host, allowing the end of its life cycle without the death of the plant tissue (SANTINI, 2014). For this, the nematodes secrete proteins and other molecules, called parasitism effectors, that interact directly with the molecules of the host. These effectors's activities, plus the stylet's mechanical action, improve their potential for colonization, survival and reproduction in plant root tissue, through modifications in the structure and functions of the host cell (HOGENHOUT *et al.*, 2009), interfering in the plant's defense response (FERNANDES, 2011).

The *P. brachyurus*-soybean interaction can be considered less complex, because there is no need for the formation of any specialized feeding cell, as it happens in other species of plant-parasitic nematodes (PPNs) (DIAS *et al.*, 2010a). This fact makes it difficult to its control (LOURENÇO, 2014), and it becomes clear the need to search for resistant genotypes. So far, few soybean genotypes have been identified as having effective resistance to *P. brachyurus* infection, and no resistance genes have been described or mapped. In addition, the use of biotechnology strategies to induce resistance to genotypes is a promising and highly important alternative, mainly using methods related to the silencing of pathogen genes via RNAi strategies (KATOCH e THAKUR, 2013; DUTTA, BANAKAR e RAO, 2015).

In general, *in vitro* studies of functional genomics in plant PPNs via RNAi are conducted by the Soaking methodology, which consists of the incubation of the nematodes in solution containing double-stranded RNA (double strand RNA - dsRNA) corresponding to the gene to be silenced. For the nematodes to feed from the soaking solution, the use of neuroactive stimulating substances is required. This method was first described by Tabara, Grishok and Mello (1998) on model organism

### *C. elegans.*

An alternative strategy to soaking for gene silencing studies that has been successfully employed is the *in planta* dsRNA production, where the plant is genetically modified to express dsRNAs through a binary vector containing the gene fragment of interest (LOURENÇO, 2014). These produced dsRNAs are then processed by the host PTGS machinery, generating small interference RNAs (siRNA), which are then ingested by the nematode at the time of infection.

The use of this strategy in PPNs was initially reported by Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006), who observed a reduction of more than 90% in *M. incognita* parasitism in tobacco plants after the silencing of genes encoding the synthesis of an integrase and splicing factor.

Recently, Hunter *et al.* (HUNTER *et al.*, 2012) proposed the use of a methodology that consists in the dsRNA delivery *in planta* with no genetic transformation event of the plant. It is based on the dsRNA root absorption, taking advantage of the fact that in plants, in addition to the dissemination of dsRNA through tissues, the silencing machinery itself is able to amplify the dsRNA through a RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). There are no reports about the application of this dsRNA delivery method in studies involving PPNs. However, results in studies involving insects makes it clear the potential for application in other organisms, such as PPNs.

Hunter *et al.* (2012) and Li *et al.* (2015) demonstrated that insects fed from plants where dsRNA was root absorbed were able to ingest the translocated dsRNA through the tissues. It is, therefore, a less costly technique when compared with the delivery via soaking and with the production of a transgenic organism. This method is known as Ectopic Delivery (ED) of dsRNA.

In the past years, RNAi-mediated gene silencing technology has become an important biotechnological tool, being successfully employed to study genes involved in the parasitism of several organisms, including PPNs, thus enabling phenotypic changes caused by the silencing of candidate genes, to an inference about its function in the parasitism establishment (MARQUES, 2008).

The knowledge of the necessary machinery for gene silencing mediated by RNAi (FIRE *et al.*, 1998; ELBASHIR *et al.*, 2001; PADDISON *et al.*, 2002; PAUL *et al.*, 2002), plus the availability of the genome and transcriptome of several species (DUTTA, BANAKAR e RAO, 2015), has allowed the use of this tool

in studies involving functional genomics and manipulation of target gene expression (LOURENÇO, 2014), making it possible to understand the role of genes required to parasitism.

Thus, this work aimed to standardize a method for functional studies in *P. brachyurus* by post transcriptional gene silencing (RNAi) by the direct dsRNA application.

## Methods

- **DOUBLE-STRANDED RNA (DSRNA) SYNTHESIS**

The dsRNA molecules used in this study were synthesized by agroRNA company (Seul, South Korea), with amplicons of 502 e 156bp, corresponding to the non-targeted GFP sequence (green fluorescent protein – dsRNA-GFP) – applied as both negative control and in the methodology standardization because of its non-complementarity with the soybean and nematode transcripts – and a nematode specific sequence – in order to confirm the occurrence of gene silencing, respectively.

- **DSRNA FEEDING ASSAY BY “SOAKING”**

For establishment of a soaking dsRNA feeding method in *P. brachyurus*, we used the methodology described by Tabara, Grishok and Mello (1998), adapted by Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013) for this plant-parasitic nematode's gender, using the non-target dsRNA-GFP for the analysis.

For that, 2000 *P. brachyurus* mixed-stages were soaked in M9 buffer (43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM NaCl, 4,6 mM NH<sub>4</sub>Cl), dsRNA (2 mg/mL) and neurostimulant octopamin (50 mM). The soaked nematodes were incubated for 16h at 22°C in the dark.

For the nematode's dsRNA absorption confirmation, it was included 2 treatments as described above. The first one plus fluorescent ingestion reporter FITC – (Fluorescein isothiocyanate Isomer I) (1 mg/mL), and the second adding dsRNA-GFP molecules labeled with fluorochrome Cy3 (0,1 mg/mL).

After incubation, the nematodes were washed in ultrapure water to remove the soaking solution. Then, the FITC and Cy3 labeled dsRNA ingestion confirmation was performed in fluorescence microscope under specific filter. In a

complementary manner, the molecular confirmation was also performed by PCR analysis using the specific primers for a 206bp region of GFP sequence.

- **ROOT DSRNA ECTOPIC DELIVERY IN SOYBEAN PLANTS**

The dsRNA Ectopic Delivery was first described by Hunter *et al.* (2012), and consists of dsRNA delivery *in planta*, with no transformation event. Aiming to evaluate the viability of this method in soybean plants, an experiment with a completely randomized design was installed. Eight days-old soybean plants of susceptible genotype TMG115RR were transferred to tubes filled with sand (1 plant per tube). After the plants reached to developmental stage V1 (formation of the first trefoil), the water supply was suspended for two days. Then, 10µg of dsRNA-GFP (in a final volume of 2 mL) were individually inoculated on root-tissues. After 12 hours, each plant was inoculated with 1000 *P. brachyurus* mixed-stages in a final volume of 4mL (250 nematodes/mL). The experiment was performed on nematology department's greenhouse at Embrapa Soybean. As a control, it was used no inoculated soybean plants.

To evaluate the translocation, permanence and stability of dsRNA-GFP on soybean plants, it was collected leaves of the first trefoil and root of 3 plants after each period of time (12, 24, 48, 96 hours after inoculation and 60 days after inoculation). The collected tissues were frozen immediately on liquid nitrogen, grinded and stored at ultrafreezer under -80°C. The total RNA of each sample was extracted using TRIZOL™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

The analysis of translocation, permanence and stability of dsRNA-GFP through soybean tissues were performed by PCR. As controls, we included soybean and *P. brachyurus* cDNA samples, as well as no inoculated dsRNA-GFP.

- **OCCURRENCE OF SPECIFIC *P. BRACHYURUS* GENE SILENCING INDUCED BY EXOGENOUS DSRNAS**

After the viability confirmation of both methods, we evaluated the occurrence of *P. brachyurus* gene silencing. For this purpose an experiment was installed as previously described, using a dsRNA complementary to a *P. brachyurus* specific gene, with unknown function. Sixty days after inoculation, the samples were processed (as previously described) and the gene expression levels were measured

by RT-qPCR using SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen) through  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) method, using as normalizer the *P. brachyurus* 18S gene. As calibrator, samples treated with dsRNA-GFP were applied.

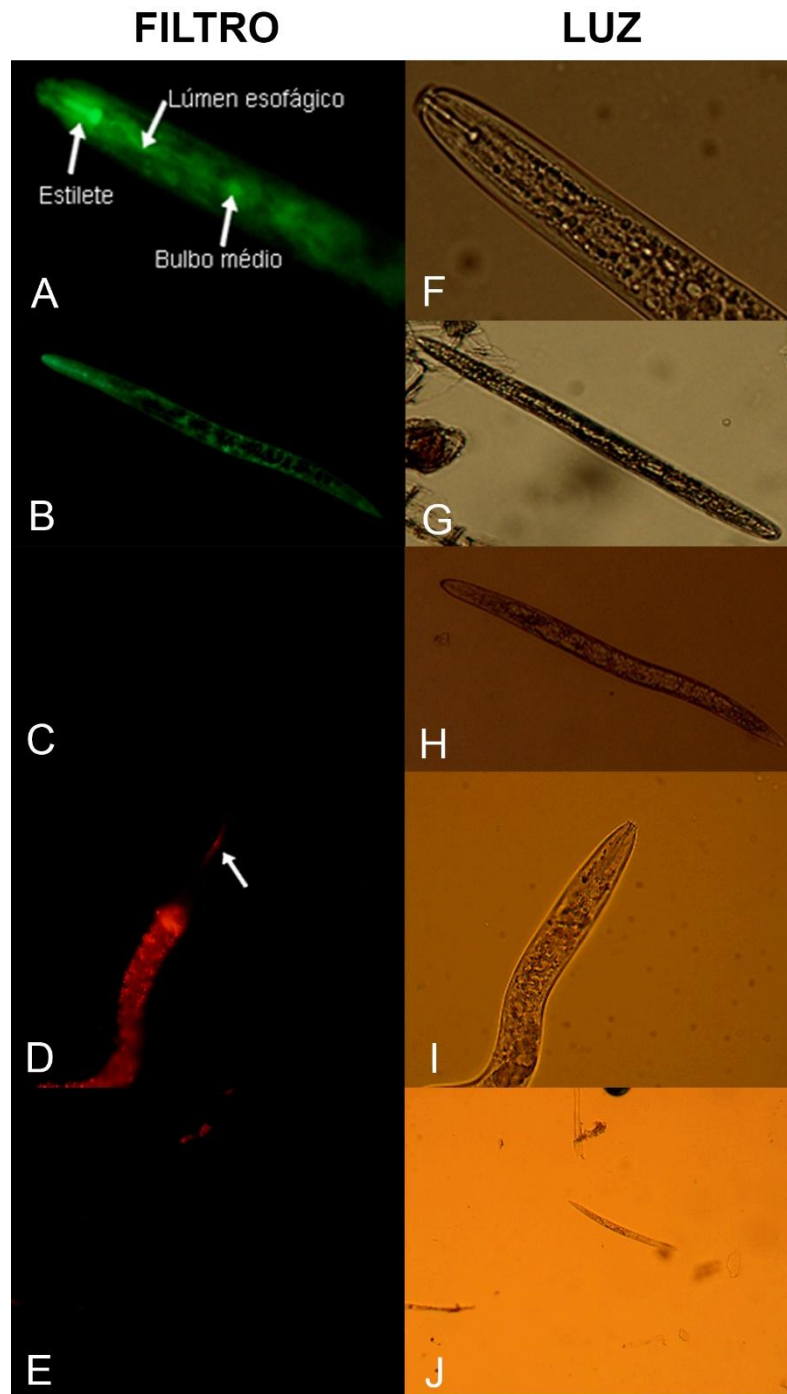
## Results and discussion

- **DSRNA FEEDING ASSAY BY “SOAKING”**

In order to establish a dsRNA-based method for gene function studies in *P. brachyurus*, the methodology first described by Tabara, Grishok and Mello (1998) and adapted by Tan, Jones e Fosu-Nyarko (2013) for this nematode's gender was performed using the best parameters defined in that work.

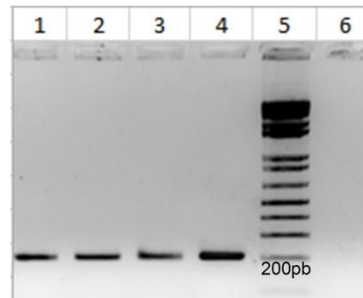
16 hours after the nematode's inoculation on soaking solution containing dsRNA, neurostimulant octopamin and FITC, it was possible to detect fluorescence signals on stylet and esophageal glands, that indicates that the nematodes were able to ingest the soaking solution through stylet. Besides that, to confirm the dsRNA effective absorption, Cy3-labeled molecules were used, also being possible to detect fluorescence signals on esophageal glands, indicating the effective dsRNA ingestion (Figure 1).

**Figure 1.** Fluorescence microscopy of *P. brachyurus* juvenile on soaking solution + dsRNA-GFP (2mg/mL) after 16 hours of incubation. A, B, F e G: Plus FITC (1mg/mL). C e H: Without FITC. D, E, I e J: Cy3-labeled dsRNA.



The molecular analysis by PCR using a GFP 206bp specific primer, showed the dsRNA-GFP presence on soaking treated nematode's tissues, corroborating the fluorescence microscopy results (Figure 2).

**Figure 2.** Amplification product of the specific GFP primer on soaking treated nematodes (206bp amplicon). 1, 2 e 3: Nematode's RNA; 4: Positive control; 5: 1Kb plus ladder; and 6: Negative control.

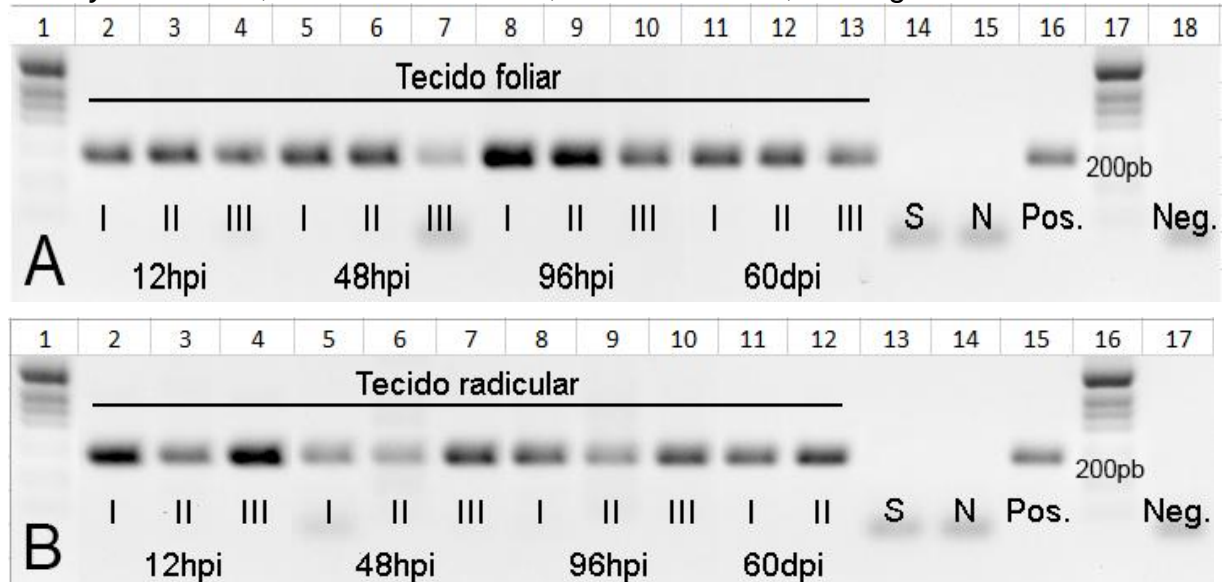


- **dsRNA ECTOPIC DELIVERY ASSAY ON SOYBEAN ROOT TISSUES**

The ectopic delivery root feeding assay results demonstrated the dsRNA-GFP presence on soybean leaf and root tissues, even after 60 days (Figure 3). We believe that the plant's irrigation suspension two days before the dsRNA inoculation may have favored the solution's root-absorption and its transportation through xylem to aerial parts.

In some organisms as *C. elegans*, the gene silencing mechanism has a systemic character, being possible to be induced in a specific cell and transmitted to adjacent tissues (FIRE *et al.*, 1998). In this model organism, that happens thanks to transmembrane proteins named SID-1 e SID-2 (WINSTON, MOLODOWITCH e HUNTER, 2002; WINSTON *et al.*, 2007). Also in *C. elegans*, this silencing signal can be transmitted to descendants, through germ cells, lasting for several generations (GRISHOK, TABARA e MELLO, 2000). Besides that, the dsRNA permanence of plant tissues can indicate that these molecules may have been replicated by the own post-transcriptional silencing machinery. This phenomenon, already described in plants and nematodes (BERNSTEIN, DENLI e HANNON, 2001; DALMAY *et al.*, 2001; SIJEN *et al.*, 2001), consists in a RNA-dependent RNA polymerase action (RdRP), that can amplify the silencing through the generation of new dsRNA molecules using the siRNAs generated by the post transcriptional machinery as templates (WATSON *et al.*, 2015).

**Figure 3.** dsRNA-GFP detection and stability on soybean leaves and root tissues. (A) Leaf tissue's RNA. 1: Ladder 1Kb; 2, 3 e 4: 12hai; 5, 6 e 7: 48hpi; 8, 9 e 10: 96hai; 11, 12 e 13: 60dai. 14: cDNA de soja; 15: *P. brachyurus* cDNA; 16: Positive control; 17: Ladder 1Kb; 18 Negative control. (B) Root tissue's RNA. 1: Ladder 1Kb; 2, 3 e 4: 12hpi; 5, 6 e 7: 48hpi; 8, 9 e 10: 96hpi; 11, 12: 60dpi. 13: cDNA de soja; 14: *P. brachyurus* cDNA; 15: Positive control; 16: Ladder 1Kb; 17 Negative control.



These results demonstrate that the dsRNA ectopic delivery for gene function studies in plant-parasitic nematodes is a promising technic, as well as its future applications for nematode control, since the permanence of the dsRNA molecules and its possible signal amplification can cover the whole pathogen's life cycle, which varies from 30 to 40 days (HUANG *et al.*, 2006; GOULART, 2008). Similar results was described by Hunter *et al.* (2012), that could confirm the dsRNA root absorption in citrus, being detectable 7 weeks after inoculation (2g of dsRNA in a 15 liters solution). It was demonstrated that the insects fed on the treated plants were able to absorb the exogenous dsRNA, indicating that the root absorbed dsRNA was plant widespread by xylem and assimilated by the insect.

Li *et al.* (2015) also demonstrated the dsRNA root absorption in experiments with the insect common brown leafhopper (*Nilaparvata lugens*) in rice, where the root tissue was submerged in a dsRNA solution (1mg/mL) plus EYFP (fluorescent ingestion marker). Then, the insects were fed by the treated plants. Through microscopy, it was possible to detect fluorescence signals on plant's sheath and stem, as much as in the insects. When the analysis was performed using a dsRNA complementary to a insect gene (carboxylesterase – Ces), it was observed death rate near to 50% 5 days after the insects were fed by the treated plants. The

presented data The presented data makes it clear that this methodology can be applied in studies involving plant-parasitic nematodes.

The dsRNA concentration differences needed to induce gene silencing on the different pathosystems already studied can be a result of its RNAi sensitivity, such as the structural differences between these organisms (TERENIUS *et al.*, 2011), which may favor the dsRNA accumulation or dispersion, indicating that this amount must be standardized for each organism, aiming to obtain an optimal concentration to induce the gene silencing (SHAKESBY *et al.*, 2009).

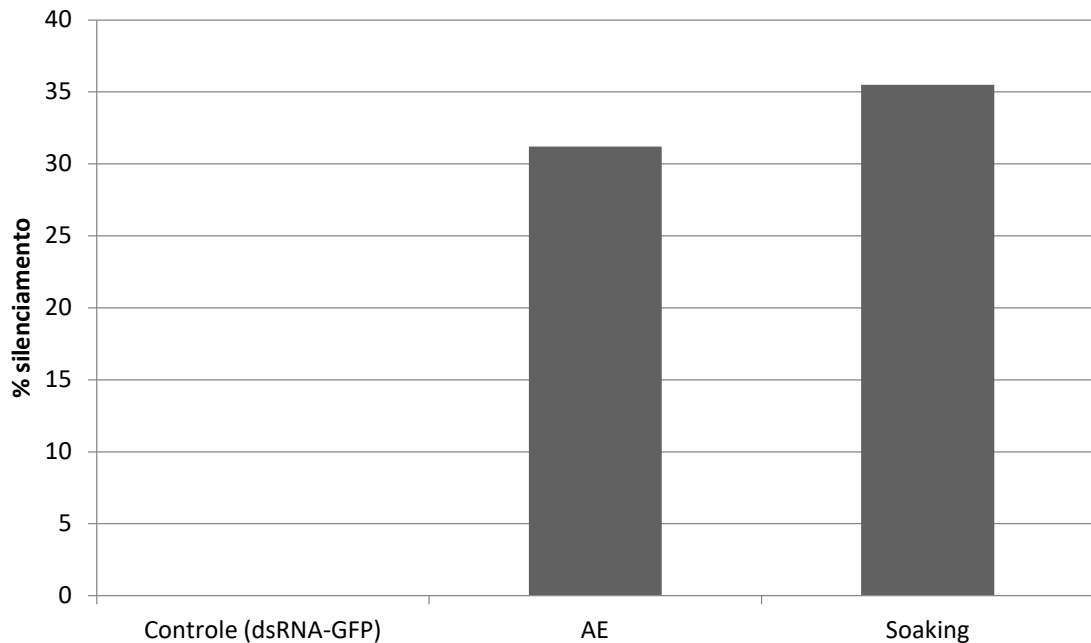
Hunter *et al.* (2012) also suggest that this technique can be applied for high scale pest and pathogen control. However, it is too early to affirm if its possibility is real, specially because a high amount of dsRNA would be necessary. Another important factor to be considered is the dsRNA stability on soil. Li *et al.* (2015) observed a dsRNA high stability, even in temperatures over 60°C or under continuous ultraviolet radiation exposure. In our study, the dsRNA molecules presented to me stable until the last evaluated period of time (60 days).

Despite the barriers to its large-scale use, this methodology has a high potential to be used in the screening of possible targets for future interference, because it is a less onerous technique compared to the soaking method, that requires for incubation and washing steps, as well as auxiliary chemicals (incubation buffer, neurostimulant) and high amounts of dsRNA.

- **OCCURENCE OF *P. BRACHYURUS* EXOGENOUS DSRNA INDUCED GENE SILENCING**

Aiming to confirm the occurrence of gene silencing, a mean sample containing the root tissues of each plant was evaluated. When the mean values of gene expression was considered, significant statistical difference was observed among the treatments (Target and non-target dsRNA) ( $p < 0,05$ ), indicating that the targeted dsRNA, both in soaking and ectopic delivery experiments, was able to induce specific gene silencing.

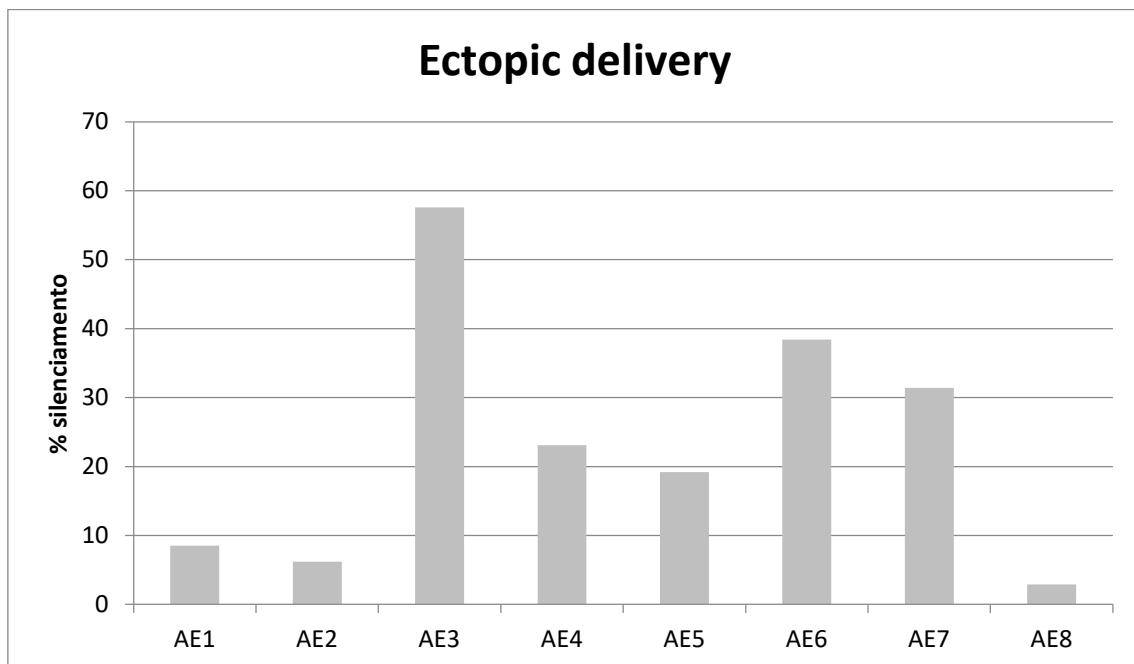
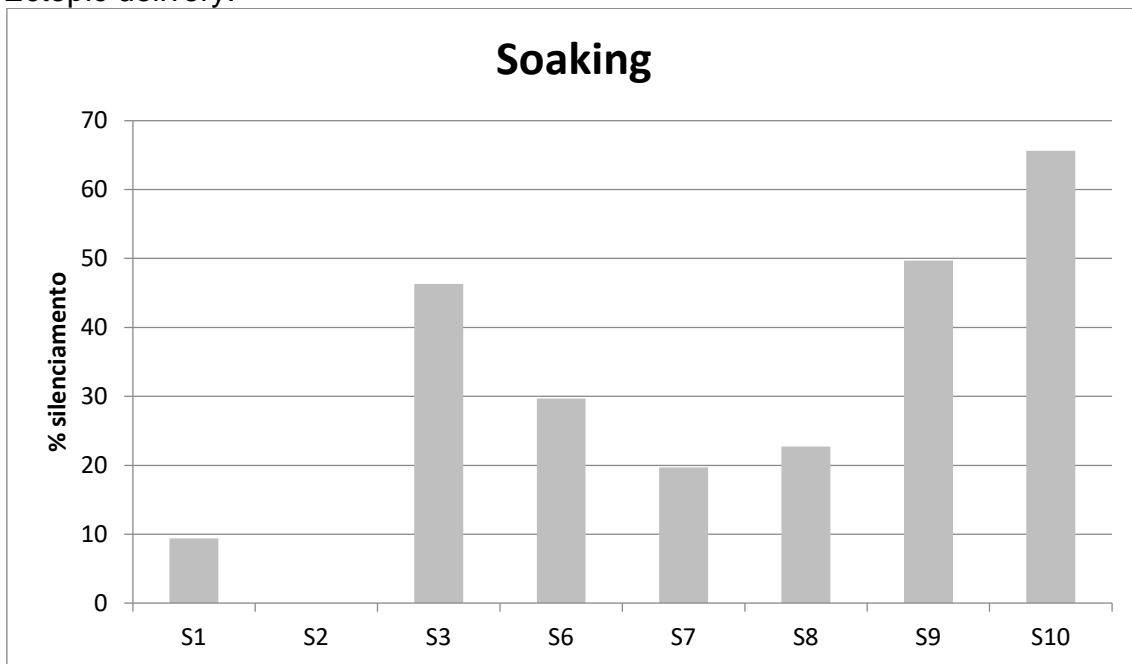
**Graphic 1.** Mean percentage of silencing (%) result of relative expression analysis by RT-qPCR of *P. brachyurus* gene after 60 days post inoculation. (S) Soaking; (ED) Ectopic delivery.



However, to evaluate the gene silencing occurrence at individual plants level, that could be hidden when the plants were evaluated together, the expression levels of all repetitions were measured for both experiments.

When we evaluate the gene expression at individual level, we could observe that the gene silencing showed high variation among biological replications for both methods, with a range of 0% to 65,6% for soaking and 2,9% to 57,6% for ectopic delivery.

**Graphic 1.** Silencing percentage (%) result of relative expression analysis by RT-qPCR of *P. brachyurus* gene after 60 days post inoculation. (S) Soaking; (ED) Ectopic delivery.



Apparently, the soaking method showed gene silencing levels slightly higher than ED. This dsRNA delivery method although more expensive, where the nematodes stay in close touch to the dsRNA molecules, seems to favor the silencing.

About the ED method, the dsRNA transfer may depend on the dsRNA machinery processing by the host plant and the pathogen's ability to absorb

and assimilate these molecules during the infection. So far, it was not described the *P. brachyurus* capacity to absorb dsRNA molecules when it was ectopically delivered. Further analysis aiming to confirm an effective *P. brachyurus* gene silencing are crucial to demonstrate that capacity.

Additionally, the dsRNA induced silencing efficiency may be affected by some factors. A possible explanation for our results is that the dsRNA amount may not be enough. On soaking experiment, where we obtained better silencing levels, we applied the parameters optimized by Tan, Jones and Fosu-Nyarko (2013), that evaluated different conditions (dsRNA concentration, neurostimulants and auxiliary chemicals, incubation period and temperature) and obtained an optimal gene silencing level in other *Pratylenchus* spp species using 2mg/mL of dsRNA. On ED experiment, we applied the dsRNA amount described in insects studies. Because it is a method still not described in analysis involving plant-parasitic nematodes, so far there is no description of an optimal concentration. Therefore, new assays are required to establish a relationship between the dsRNA amount and its response on the targeted organism.

Beyond the dsRNA amount, its size also must be considered. Although silencing has been demonstrated using dsRNAs with sizes ranging between <30bp (XIA *et al.*, 2002) to >1800bp (HUVENNE e SMAGGHE, 2010), there is no consensus about an optimal sequence size to be used. Despite this, several authors suggest that molecules size between 140 and 520bp are ideal. (LINZ *et al.*, 2013; ANDRADE e HUNTER, 2016), because it makes it possible that a smaller region can be targeted of a higher number of siRNAs when compared to long dsRNA sequences (>1000bp). In addition, a higher number of generated siRNAs reduces the occurrence of resistance by genetic variation among the individuals (ANDRADE e HUNTER, 2016). Tan, Jones and Fosu-Nyarko (2013) observed a reduction of *P. thornei*'s reproduction higher than 70% in carrot cylinders using dsRNAs complementary to muscular contraction and locomotion genes (*pat-10* e *unc-87*) using sequence sizes of 372 e 159bp, respectively.

Another important factor is the target mRNA to be silenced (FAR e SCZAKIEL, 2003). Even though there is no data about an ideal target region, the presence of secondary structures in the mRNA may alter the silencing efficiency. Gredell, Berger and Walton (2008) observed higher reduction levels of target genes expression using dsRNAs complementary to unpaired 5' and 3' ends when compared

to regions with predicted secondary structures. It makes it clear the need to evaluate dsRNA sequences corresponding to different mRNA regions.

In the *P. brachyurus* gene used in this work, we designed a 156bp sequence. Considering its high similarity to other species's homologous gene, including the soybean transcripts, with highly conserved regions among organisms, it was not possible to design a sequence bigger than this one, what would result in a non-specific silencing.

Additionally, the expression levels of target's mRNA may influence the silencing levels. Hu *et al.*, (2004) demonstrated that transcripts with low expression are less susceptible to siRNA's mediated degradation, with lower silencing levels.

The presented data suggests the need for new optimization experiments aiming to validate the influence of these factors on the targeted gene silencing so it is going to be possible to identify the protein function on the plant-pathogen interaction.

## **Conclusion**

Through fluorescence microscopy, it was possible to confirm that the nematodes were able to ingest dsRNA molecules, being possible to detect fluorescence signals in the stylet and esophageal glands.

The dsRNA delivery assay, by ectopic root application, confirmed that dsRNA-GFP was absorbed by root and translocated to the aerial part, remaining detectable even after 60 days of inoculation.

The dsRNA Ectopic Delivery methodology in soybean roots was shown to be promising for the functional study of genes in PPNS.

Although in both methodologies it was possible to observe a decrease in target gene expression levels, the soaking methodology resulted in slightly better silencing levels.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALAMBERT, M. R. **Estimação estocástica de parâmetros produtivos da soja uso do modelo PPDSO em um estudo de caso em Piracicaba/SP**. 2010. Dissertação (Mestrado). Escola de Economia de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas, São Paulo.
- 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. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 247-258, 2007. ISSN 0014-4894.
- ANDRADE, C.; HUNTER, W. B. RNA Interference—Natural Gene-Based Technology for Highly Specific Pest Control (HiSPeC). **IY Abdurakhmonov (Croatia: InTech)**, p. 391-409, 2016.
- ARAIZ, C.; CHÂTEAU, M.-T.; GALAS, S. 14-3-3 regulates life span by both DAF-16-dependent and-independent mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 6, p. 505-519, 2008. ISSN 0531-5565.
- ARAÚJO, F. G. D. **Aspectos da biologia e manejo do nematoide de cisto da soja**. 2013. Tese (Doutorado). Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.; ATKINSON, H. J.; MCPHERSON, M. J. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 18, n. 10, p. 1099-1106, 2005. ISSN 0894-0282.
- BAKHETIA, M.; URWIN, P.; ATKINSON, H. qPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 20, n. 3, p. 306-312, 2007. ISSN 0894-0282.
- BELLAFIORE, S.; SHEN, Z.; ROSSO, M.-N.; ABAD, P.; SHIH, P.; BRIGGS, S. P. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 10, p. e1000192, 2008.
- BERG, R. H.; TAYLOR, C. **Cell biology of plant nematode parasitism**. Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 3540852158.
- BERNSTEIN, E.; DENLI, A. M.; HANNON, G. J. The rest is silence. **Rna**, v. 7, n. 11, p. 1509-1521, 2001. ISSN 1355-8382.
- BONATO, E. R. **Estresses em Soja**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000. 254 p.
- BRASIL, S. D. E. D. A. E. D. A. **Soja – Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2012. DERAL - Departamento de Economia Rural, Brasília.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, 2004. ISSN

0022-0957.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. **Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management**. Brill, 2007. ISBN 9047424018.

CAVALETT, O. **Análise do ciclo de vida da soja**. 2008. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CEPEA, C. D. E. A. E. E. A.-E. U. Relatório PIBAgro-Brasil GDP AGRIBUSINES – BRAZIL OUTLOOK. **PIB do Agronegócio BRASIL**, p. 1-23, 2016.

CHEN, Q.; REHMAN, S.; SMANT, G.; JONES, J. T. Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 18, n. 7, p. 621-625, 2005. ISSN 0894-0282.

CHEVALIER, D.; MORRIS, E. R.; WALKER, J. C. 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 67-91, 2009. ISSN 1543-5008.

CONAB, C. N. D. A. Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos. **Safra 2016/2017**, v. 4, p. 1-160, 2017. ISSN 2318-6852.

COOLEN, W.; D'HERDE, C. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **Ghent**, 1972.

COOMBS, G.; MOTTRAM, J. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitology**, v. 114, n. 07, p. 61-80, 1997. ISSN 1469-8161.

COSGROVE, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 391-417, 1999. ISSN 1040-2519.

COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Ed. de Ivo Manica e José Antonio Costa, 1996.

DALMAY, T.; HORSEFIELD, R.; BRAUNSTEIN, T. H.; BAULCOMBE, D. C. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 8, p. 2069-2077, 2001. ISSN 0261-4189.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R.; BAUM, T. J. Parasitism genes: what they reveal about parasitism. 2009.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; MITCHUM, M. G.; BAUM, T. J. Parasitism proteins in nematode–plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 360-366, 2008. ISSN 1369-5266.

DE BOER, A. H.; VAN KLEEFF, P. J.; GAO, J. Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. **Protoplasma**, v. 250, n. 2, p. 425-440, 2013. ISSN 0033-

183X.

DE OLIVEIRA, S. V.; DOS REYS, M. A. ESTRUTURAÇÃO E CONSOLIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL-BASE DE SOJA-NO RIO GRANDE DO SUL.

**Extensão Rural**, n. 17, p. 24, 2009. ISSN 2318-1796.

DIAS, W. P.; ASMUS, G. L.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S.

**Nematoides**. Londrina: Embrapa Soja, 2010a. 173-206.

DIAS, W. P.; SILVA, J. F.; CARNEIRO, G. E.; GARCIA, A.; ARIAS, C. A. Nematóide de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. **Nematologia**

**brasileira**, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. D. S. Nematóides em Soja: Identificação e Controle. **Circular Técnica 76**, p. 8, 2010b.

DOYLE, E. A.; LAMBERT, K. N. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*.

**Molecular plant-microbe interactions**, v. 15, n. 6, p. 549-556, 2002. ISSN 0894-0282.

DOYLE, E. A.; LAMBERT, K. N. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 16, n. 2, p. 123-131, 2003. ISSN 0894-0282.

DUBREUIL, G.; MAGLIANO, M.; DELEURY, E.; ABAD, P.; ROSSO, M.

Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism\*. **New Phytologist**, v. 176, n. 2, p. 426-436, 2007. ISSN 1469-8137.

DUTTA, T. K.; BANAKAR, P.; RAO, U. The status of RNAi-based transgenic research in plant nematology. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2015.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001. ISSN 0028-0836.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 953-971, 2007. ISSN 1754-2189.

EMBRAPA, E. B. D. P. A. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. SOJA, E. Londrina: Documentos 349 2014.

FALEIRO, V.; FARIAS NETO, A.; BORGES, D.; SILVA, J.; DIAS, W.; RAMOS

JUNIOR, E.; SILVA NETO, S. Reação de cultivares de soja a *pratylenchus*

*brachyurus*. Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2012, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

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. **Gene**, v. 349, p. 87-95, 2005. ISSN 0378-1119.

FAR, R. K. K.; SCZAKIEL, G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 15, p. 4417-4424, 2003. ISSN 0305-1048.

FARIAS, J. R. B. Limitações climáticas à obtenção de rendimentos máximos de soja. Mercosoja 2011. Quinto Congreso de la Soja en el Mercosur. Rosario, Argentina, 2011.

FENG, H.; WEI, L.; CHEN, H.; ZHOU, Y. Calreticulin is required for responding to stress, foraging, and fertility in the white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 58-67, 2015. ISSN 0014-4894. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489415001332](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489415001332)>.

FERNANDES, M. B. **Identificação e caracterização de genes que codificam proteínas secretadas por *Hemileia vastatrix* na interação com o cafeeiro**. 2011. Dissertação (Mestrado). Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. D.; LOPES, E.; DIAS-ARIEIRA, C. Manejo sustentável de fitonematoides. **Viçosa: UFV**, p. 71-85, 2010.

FINHOLDT, R. S. **Estimativas do coeficiente de herdabilidade entre e dentro de famílias F5 de soja**. 2012. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Jaboticabal.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998. ISSN 0028-0836.

FONSECA, R. G. **Comportamento de híbridos de milho em sucessão a soja, ao nematoide *Pratylenchus brachyurus***. 2012. Dissertação (Mestrado). Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FOSU-NYARKO, J.; TAN, J. A. C.; GILL, R.; AGREZ, V. G.; RAO, U.; JONES, M. G. De novo analysis of the transcriptome of *Pratylenchus zeae* to identify transcripts for proteins required for structural integrity, sensation, locomotion and parasitism. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 4, p. 532-552, 2016. ISSN 1364-3703.

FRAGOSO, R. D. R.; LOURENÇO, I. T.; VIANA, A. A. B.; SOUZA, D. D. S.; DE ANDRADE, R.; MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C. M.; PINTO, E. D. C.; ROCHA, T. L. Interação molecular planta-nematóide. **Embrapa Cerrados. Documentos**, 2007.

FREITAS, M. D. C. M. D. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer: Goiânia**, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

FRV, F. R. V. **LEVANTAMENTO POPULACIONAL DE ESPÉCIES DE NEMATÓIDES NA CULTURA DA SOJA NA REGIÃO DO MÉDIO NORTE DE MATO GROSSO**. NEMATÓIDES. Rio Verde: Fundação de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Rio Verde. 3 2014.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 40, n. 1, p. 617-647, 2000. ISSN 0362-1642.

GAL, T. Z.; AUSSENBERG, E. R.; BURDMAN, S.; KAPULNIK, Y.; KOLTAI, H. Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. **Planta**, v. 224, n. 1, p. 155-162, 2006. ISSN 1432-2048. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-0204-x>>.

GAO, B.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Molecular characterisation and developmental expression of a cellulose-binding protein gene in the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1377-1383, 2004. ISSN 0020-7519.

GAO, B.; ALLEN, R.; MAIER, T.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Identification of Putative Parasitism Genes Expressed in the Esophageal Gland Cells of the Soybean Cyst Nematode *Heterodera glycines*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 14, n. 10, p. 1247-1254, 2001/10/01 2001. ISSN 0894-0282. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.10.1247>>. Acesso em: 2017/01/21.

GAO, B.; ALLEN, R.; MAIER, T.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Identification of a New  $\beta$ -1,4-endoglucanase Gene Expressed in the Esophageal Subventral Gland Cells of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 1, p. 12-15, 2002. ISSN 0022-300X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620536/>>.

GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. G. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 415-421, 2011. ISSN 1369-5266. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526611000240>>.

GODFREY, G. A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus* n. sp. **Phytopathology**, v. 19, p. 611-629, 1929.

GOELLNER, M.; SMANT, G.; DE BOER, J.; BAUM, T.; DAVIS, E. Isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from *Globodera tabacum* and their expression during parasitism. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 2, p. 154, 2000.

GOELLNER, M.; WANG, X.; DAVIS, E. L. Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase Expression in Compatible Plant-Nematode Interactions. **The plant cell**, v. 13, n. 10, p. 2241-2256, 2001. ISSN 1040-4651 1532-298X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC139156/>>.

GOMES, A. G. Sistema agroindustrial da soja: em busca da competitividade perdida.

**Agrianual**, p. 26-28, 2001.

GONZAGA, V.; DOS SANTOS, J. M. Estudo Comparativo de Multiplicação In Vitro de Seis Espécies de *Pratylenchus* em Cilindros de Cenoura. **Nematologia brasileira**, v. 34, n. 4, p. 226-230, 2010. ISSN 0102-2997.

GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Embrapa Cerrados Planaltina, 2008.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011.

GREDELL, J. A.; BERGER, A. K.; WALTON, S. P. Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: A large-scale study. **Biotechnology and bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 744-755, 2008. ISSN 1097-0290.

GRIGOLLI, J. F. J.; ASMUS, G. L. Manejo de Nematoides na Cultura da Soja. **Embrapa Agropecuária Oeste-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)**, 2014.

GRISHOK, A.; TABARA, H.; MELLO, C. C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. **Science**, v. 287, n. 5462, p. 2494-2497, 2000. ISSN 0036-8075.

HASSAN, S.; BEHM, C. A.; MATHESIUS, U. Effectors of plant parasitic nematodes that re-program root cell development. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 10, p. 933-942, 2010. ISSN 1445-4416.

HIRAKURI, M. H. Impactos econômicos de estresses bióticos e abióticos na produção de soja **Circular Técnica 105**, p. 1-8, 2014.

HOGENHOUT, S. A.; VAN DER HOORN, R. A.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2009. ISSN 0894-0282.

HU, X.; HIPOLITO, S.; LYNN, R.; ABRAHAM, V.; RAMOS, S.; WONG-STAAAL, F. Relative gene-silencing efficiencies of small interfering RNAs targeting sense and antisense transcripts from the same genetic locus. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 15, p. 4609-4617, 2004. ISSN 0305-1048.

HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14302-14306, 2006. ISSN 0027-8424.

HUNTER, W. B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B. R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85-87, 2012. ISSN 0147-1724.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227-235, 2010. ISSN 0022-1910.

IBRAHIM, H. M.; ALKHAROUF, N. W.; MEYER, S. L.; ALY, M. A.; ABD EL KADER, Y.; 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. ISSN 0014-4894.

JAUBERT, S.; LAFFAIRE, J.-B.; LEDGER, T.; ESCOUBAS, P.; AMRI, E.-Z.; ABAD, P.; ROSSO, M. Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 7, p. 873-880, 2004. ISSN 0020-7519.

JEYARATNAM, J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World health statistics quarterly**, v. 43, p. 139-144, 1990.

JONES, D. H.; LEY, S.; AITKEN, A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. **Febs Letters**, v. 368, n. 1, p. 55-58, 1995. ISSN 0014-5793.

JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Springer, 2011. ISBN 940070433X.

JONES, M.; FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. **Annals of applied biology**, v. 164, n. 2, p. 163-181, 2014. ISSN 1744-7348.

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. ISSN 0167-4412.

JOSEPH, S.; GHEYSEN, G.; SUBRAMANIAM, K. RNA interference in *Pratylenchus coffeae*: Knock down of *Pc-pat-10* and *Pc-unc-87* impedes migration. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 186, n. 1, p. 51-59, 2012. ISSN 0166-6851.

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. ISSN 0963-7486.

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. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 1233-1243, 2007. ISSN 0892-6638.

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. ISSN 0032-0935.

KULCHESKI, F. R. **Identificação e análise de expressão de microRNAs em soja sob estresse biótico e abiótico**. 2013. Tese (Doutorado). Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LI, H.; GUAN, R.; GUO, H.; MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 11, p. 2277-2285, 2015. ISSN 1365-3040.

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. ISSN 1467-7652.

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, 2010. ISSN 0032-0935.

LILLEY, C. J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W. L.; URWIN, P. E. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 701-711, 2007. ISSN 1364-3703.

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. ISSN 0020-7519.

LINZ, D. M.; CLARK-HACHTTEL, C. M.; BORRÀS-CASTELLS, F.; TOMOYASU, Y. Larval RNA interference in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 92, p. e52059-e52059, 2013.

LIU, D.; CHEN, L.; DUAN, Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of two plant-parasitic nematode 14-3-3 genes. **Journal of Agricultural Science**, v. 3, n. 4, p. 86, 2011. ISSN 1916-9760.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023.

LOPES, M. **Aspectos histopatológicos e mudanças na expressão de genes em genótipos de soja resistente, durante a interação com *Meloidogyne javanica***. 2009. Tese (Doutorado). Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LOPES, V. S. **Caracterização da família de genes HSP20 em *Glycine max***. 2012. Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LOURENÇO, I. T. **Validação funcional de genes envolvidos com estresse de *Meloidogyne incognita* via RNA interferente in planta**. 2014. Tese (Doutorado). Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

MARQUES, E. P. **Estabelecimento da técnica de interferência pelo RNA-RNAi em ancilostomídeos utilizando um gene candidato a vacina como modelo.** 2008. Dissertação (Mestrado). Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 563-574, 2002. ISSN 0092-8674.

MATSUO, E. **RESISTÊNCIA DA SOJA À FERRUGEM ASIÁTICA: HIBRIDAÇÃO MICROSSATÉLITES, HERANÇA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES.** 2012. Tese (Doutorado). Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MCQUEEN-MASON, S. J.; COSGROVE, D. J. Expansin mode of action on cell walls (analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). **Plant Physiology**, v. 107, n. 1, p. 87-100, 1995. ISSN 1532-2548.

MITCHUM, M.; HUSSEY, R.; DAVIS, E.; BAUM, T.; PUNJA, Z. Application of biotechnology to understand pathogenesis in nematode plant pathogens. **Biotechnology and plant disease management. Wallingford, UK: CABI**, p. 58-84, 2007.

MOODY, E.; LOWNSBERY, B.; AHMED, J. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, v. 5, n. 3, p. 225, 1973.

MOORE, B. Specific acidic proteins of the nervous system. **Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integratin**, p. 343-359, 1967.

MOUNTAIN, W. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. **Proceedings of the helminthological Society of Washington**, v. 22, n. 1, p. 49-52, 1955.

MUSLIN, A. J.; TANNER, J. W.; ALLEN, P. M.; SHAW, A. S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 889-897, 1996. ISSN 0092-8674.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The plant cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990. ISSN 1040-4651.

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 B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 99-115, 2009. ISSN 0962-8436.

OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Seminars in cell & developmental biology*, 2011, Elsevier. p.663-672.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. 1966.

OTTMANN, C. Small-molecule modulators of 14-3-3 protein–protein interactions. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4058-4062, 2013. ISSN 0968-0896.

OYEKAN, P. O.; BLAKE, C.; MITCHELL, J. Histopathology of pea roots axenically infected by *Pratylenchus penetrans*. **Journal of Nematology**, v. 4, n. 1, p. 32, 1972.

PADDISON, P. J.; CAUDY, A. A.; BERNSTEIN, E.; HANNON, G. J.; CONKLIN, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. **Genes & development**, v. 16, n. 8, p. 948-958, 2002. ISSN 0890-9369.

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. ISSN 1932-6203.

PARK, J.-E.; LEE, K. Y.; LEE, S.-J.; OH, W.-S.; JEONG, P.-Y.; WOO, T.; KIM, C.-B.; PAIK, Y.-K.; KOO, H.-S. The efficiency of RNA interference in *Bursaphelenchus xylophilus*. **Molecules and cells**, v. 26, n. 1, p. 81-86, 2008. ISSN 1016-8478.

PAUL, C. P.; GOOD, P. D.; WINER, I.; ENGELKE, D. R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505-508, 2002. ISSN 1087-0156.

POPEIJUS, H.; OVERMARS, H.; JONES, J.; BLOK, V.; GOVERSE, A.; HELDER, J.; SCHOTS, A.; BAKKER, J.; SMANT, G. Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode. **nature**, v. 406, n. 6791, p. 36-37, 2000. ISSN 0028-0836.

RIBEIRO, N.; DIAS, W.; HOMECHIN, M.; SILVA, J.; FRANCISCO, A. Avaliação da reação de espécies vegetais ao nematoide das lesões radiculares. **Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, v. 29, p. 64, 2007.

ROSENQUIST, M.; ALSTERFJORD, M.; LARSSON, C.; SOMMARIN, M. Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 1, p. 142-149, 2001. ISSN 1532-2548.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. Nematoides. **Ageitec - Agência Embrapa de Informação e Tecnologia**, 2008.

ROSSO, M.-N.; FAVERY, B.; PIOTTE, C.; ARTHAUD, L.; DE BOER, J. M.; HUSSEY, R. S.; BAKKER, J.; BAUM, T. J.; ABAD, P. Isolation of a cDNA encoding a  $\beta$ -1, 4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 12, n. 7, p. 585-591, 1999. ISSN 0894-0282.

ROSSO, M.; JONES, J.; ABAD, P. RNAi and functional genomics in plant parasitic

nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 47, p. 207-232, 2009. ISSN 0066-4286.

SÁ, M. G. D. **ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES EXPRESSOS EM GLÂNDULA ESOFÁGICA DORSAL DE *MELOIDOGYNE INCÓGNITA* ENVOLVIDOS NO FITOPARASITISMO**. 2011. Dissertação (Mestrado). Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília.

SANTINI, L. **Análise, via RNAseq, do transcrito do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta à infecção pelo nematoide das galhas**. 2014. Tese (Doutorado). Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SEDIYAMA, T. Tecnologias de produção e usos da soja. **Londrina: Mecenas**, v. 306, 2009.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.; BARROS, H. Origem, evolução e importância econômica. **Tecnologia de produção e usos da soja**. Londrina: Editora Mecenas, p. 1-5, 2009.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. D. C.; REIS, M. Melhoramento da soja. **Melhoramento de espécies cultivadas**, v. 2, p. 553-603, 2005.

SEHNKE, P. C.; DELILLE, J. M.; FERL, R. J. Consummating signal transduction the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. **The plant cell**, v. 14, n. suppl 1, p. S339-S354, 2002. ISSN 1532-298X.

SHAKESBY, A.; WALLACE, I.; ISAACS, H.; PRITCHARD, J.; ROBERTS, D.; DOUGLAS, A. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2009. ISSN 0965-1748.

SHINGLES, J.; LILLEY, C.; ATKINSON, H.; URWIN, P. *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 114-120, 2007. ISSN 0014-4894.

SIJEN, T.; FLEENOR, J.; SIMMER, F.; THIJSSSEN, K. L.; PARRISH, S.; TIMMONS, L.; PLASTERK, R. H.; FIRE, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001. ISSN 0092-8674.

SILES-LUCAS, M.; MERLI, M.; MACKENSTEDT, U.; GOTTSTEIN, B. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. **Vaccine**, v. 21, n. 5, p. 431-439, 2003. ISSN 0264-410X.

SILVA, R. A. D.; SERRANO, M. A.; GOMES, A. C.; BORGES, D. C.; DE SOUZA, A. A.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no estado do Mato Grosso. **Fitopatol. bras**, v. 29, p. 3, 2004.

SILVA, S. L. S. **SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES A RAÇAS DE *Heterodera glycines* E A *Pratylenchus brachyurus***. 2014. Dissertação (Mestrado). Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Mato Grosso, Rondonópolis.

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. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 1, p. 315-324, 2009. ISSN 0022-0957.

SMANT, G.; STOKKERMANS, J. P.; YAN, Y.; DE BOER, J. M.; BAUM, T. J.; WANG, X.; HUSSEY, R. S.; GOMMERS, F. J.; HENRISSAT, B.; DAVIS, E. L. Endogenous cellulases in animals: isolation of  $\beta$ -1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 4906-4911, 1998. ISSN 0027-8424.

SMITH, A. J.; DAUT, J.; SCHWAPPACH, B. Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 181-191, 2011. ISSN 1548-9213.

SOUZA JÚNIOR, J. D. A. D. **Análise funcional de genes de *Meloidogyne incognita* envolvidos na interação planta-nematoide**. 2012. Tese (Doutorado). Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília.

STEEVES, R. M.; TODD, T. C.; ESSIG, J. S.; TRICK, H. N. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. **Functional Plant Biology**, v. 33, n. 11, p. 991-999, 2006. ISSN 1445-4416.

TABARA, H.; GRISHOK, A.; MELLO, C. C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. **Science**, v. 282, n. 5388, p. 430-431, 1998.

TAN, J.-A. C.; JONES, M. G.; FOSU-NYARKO, J. Gene silencing in root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) significantly reduces reproduction in a plant host. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 166-178, 2013. ISSN 0014-4894.

TERENIUS, O.; PAPANICOLAOU, A.; GARBUTT, J. S.; ELEFThERIANOS, I.; HUVENNE, H.; KANGINAKUDRU, S.; ALBRECHTSEN, M.; AN, C.; AYMERIC, J.-L.; BARTHEL, A. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011. ISSN 0022-1910.

TORRES, R. G.; RIBEIRO, N. R.; BOER, C. A.; FERNANDES, O.; FIGUEIREDO, A. G.; NETO, A. F.; CORBO, E. **Manejo integrado de nematoides em sistema de plantio direto no cerrado** 2009.

TORTO, T. A.; LI, S.; STYER, A.; HUITEMA, E.; TESTA, A.; GOW, N. A.; VAN WEST, P.; KAMOUN, S. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome research**, v. 13, n. 7, p. 1675-1685, 2003. ISSN 1088-9051.

UEBEL, M.; GARBIN, L. F.; SILVA, R. A.; SANTOS, P. S. REAÇÃO DE CULTIVARES DE *Brachiaria* spp. a *Pratylenchus brachyurus*. **CONNECTION LINE**, n. 10, 2014. ISSN 1980-7341.

UEHARA, T.; KUSHIDA, A.; MOMOTA, Y. PCR-based cloning of two  $\Xi$ -1, 4-endoglucanases from the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. **Nematology**, v. 3, n. 4, p. 335-341, 2001. ISSN 1568-5411.

URWIN, P.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 15, n. 8, p. 747-752, 2002. ISSN 0894-0282.

USDA, U. S. D. O. A. World Agricultural Supply and Demand Estimates. p. 40, 2016.

VARSHNEY, R. K.; CLOSE, T. J.; SINGH, N. K.; HOISINGTON, D. A.; COOK, D. R. Orphan legume crops enter the genomics era! **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 202-210, 2009. ISSN 1369-5266. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526608002021>>.

VIEIRA, P.; EVES-VAN DEN AKKER, S.; VERMA, R.; WANTOCH, S.; EISENBACK, J. D.; KAMO, K. The *Pratylenchus penetrans* Transcriptome as a Source for the Development of Alternative Control Strategies: Mining for Putative Genes Involved in Parasitism and Evaluation of in planta RNAi. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144674, 2015. ISSN 1932-6203.

WALAWAGE, S. L.; BRITTON, M. T.; LESLIE, C. A.; URATSU, S. L.; LI, Y.; DANDEKAR, A. M. Stacking resistance to crown gall and nematodes in walnut rootstocks. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 668, 2013. ISSN 1471-2164.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICKE, R. **Biologia molecular do gene**. Artmed Editora, 2015. ISBN 858271209X.

WEISCHER, B.; BROWN, D. J. **Conhecendo os nematóides: nematologia geral**. Pensoft, 2001. ISBN 9546421375.

WINSTON, W. M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C. P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2456-2459, 2002. ISSN 0036-8075.

WINSTON, W. M.; SUTHERLIN, M.; WRIGHT, A. J.; FEINBERG, E. H.; HUNTER, C. P. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10565-10570, 2007. ISSN 0027-8424.

XIA, H.; MAO, Q.; PAULSON, H. L.; DAVIDSON, B. L. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1006-1010, 2002. ISSN 1087-0156.

XIAO, B.; SMERDON, S. J.; JONES, D. H.; DODSON, G. G. Structure of a 14-3-3

protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. **nature**, v. 376, n. 6536, p. 188, 1995. ISSN 0028-0836.

YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K.; SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 148, n. 2, p. 219-222, 2006. ISSN 0166-6851.

YAN, Y.; SMANT, G.; STOKKERMANS, J.; QIN, L.; HELDER, J.; BAUM, T.; SCHOTS, A.; DAVIS, E. Genomic organization of four  $\beta$ -1, 4-endoglucanase genes in plant-parasitic cyst nematodes and its evolutionary implications. **Gene**, v. 220, n. 1, p. 61-70, 1998. ISSN 0378-1119.