

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Itamara Mezzalira

**Análise funcional de proteínas efetoras de
Meloidogyne incognita com potencial aplicação no controle
de fitonematoides**

Brasília, DF

2013

Itamara Mezzalira

**Análise funcional de proteínas efetoras de
Meloidogyne incognita com potencial aplicação no controle
de fitonematoides**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Molecular da
Universidade de Brasília como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Biologia Molecular.**

Orientadora:

Maria Fátima Grossi de Sá, PhD

Coorientadores:

Rodrigo da Rocha Fragoso, Dr

Diana Fernandez, PhD

Brasília, DF

2013

Banca Examinadora

Dra. Janice de Almeida Engler

INRA-CNRS-Université de Nice-Sophia Antipolis, Sophia-Antipolis, France.

Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Dr. José Dijair Antonino de Souza Júnior (Suplente)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e a Universidade de Brasília pela oportunidade.

À Capes pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Maria Fátima Grossi de Sá, pela orientação, confiança, pelas ótimas condições de trabalho oferecidas e por todas as oportunidades a mim proporcionadas.

Ao coorientador e amigo, Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso, por todos os ensinamentos e pela dedicação em ensinar, pelas discussões científicas, pela orientação no desenvolvimento dos trabalhos realizados no LIMPP.

À coorientadora, Dra. Diana Fernandez, pela orientação, confiança e pela ótima acolhida na equipe "Effecteurs et Cibles" do IRD.

À Dra. Magda Beneventi, pela disponibilidade em compartilhar o trabalho realizado e todas as informações a ele referentes, e pela ajuda na escrita.

A equipe do IRD: ao Dr. Michel Nicole, diretor da UMR "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs", pela acolhida na unidade; à Dra. Anne-Sophie Petitot pela ajuda e orientação nas manipulações; à Dra. Karine Lambou e ao Geoffrey Manelli pela ajuda nos experimentos de localização subcelular; e ao Phong pela colaboração no dia-a-dia.

À equipe da plataforma REFUGE. Ao Dr. Emmanuel Guiderdoni, líder da equipe, pela acolhida. À Delphine Mieulet, Aurore Vernet e Martine Bes pela orientação e colaboração no desenvolvimento dos trabalhos.

À toda a equipe do LIMPP, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e à família, que tornaram esta caminhada mais amena e prazerosa.

Sumário

Lista de tabelas	7
Lista de figuras	8
Resumo	9
Abstract	10
1. Introdução.....	11
1.1. Proteínas efetoras	13
1.2. Interação arroz-nematoide.....	15
1.3. Contexto de desenvolvimento do trabalho	18
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Material e métodos	22
3.1. Isolamento e clonagem dos genes candidatos.....	22
3.2. Cinética de expressão dos genes candidatos durante a interação arroz - <i>M. incognita</i>	23
3.2.1. Cultura e coleta de <i>M. incognita</i> raça 1.....	23
3.2.2. Ensaio de infecção de <i>O. sativa</i> por <i>M. incognita</i>	24
3.2.3. Extração de RNA total	25
3.2.4. Reação de transcrição reversa	25
3.2.5. PCR quantitativa (qRT-PCR)	25
3.3. Localização subcelular dos efetores em células vegetais	26
3.3.1. Vetores de expressão dos genes candidatos fusionados a GFP.....	26
3.3.2. Transformação transiente de células de epiderme de cebola.....	28
3.4. Transformação genética de arroz (<i>O. sativa</i>) para superexpressão e silenciamento dos genes candidatos.....	29

3.4.1. Identificação do peptídeo sinal de secreção	29
3.4.2. Construção dos vetores para superexpressão das proteínas <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	29
4.3.3 Construção dos vetores para silenciamento dos genes candidatos	31
3.4.3. Transformação genética de arroz	36
3.4.4. Caracterização molecular das plantas transgênicas de arroz.....	36
3.4.4.1. Southern Blot	36
3.4.4.2. qPCR	37
4. Resultados.....	39
4.1. Análise dos genes e proteínas <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	39
4.2. Cinética de expressão dos genes candidatos durante a interação arroz-nematoide.....	42
4.3. Localização subcelular dos efetores em células vegetais	44
4.4. Transformação genética de arroz.....	47
4.5. Caracterização molecular das plantas transgênicas	49
4.6. Seleção das linhagens e obtenção da geração T2.....	52
5. Discussão.....	53
6. Conclusões e perspectivas.....	58
7. Referências	59
Anexos	63

Lista de tabelas

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i> e clonagem em vetor pGEM [®] -T Easy.....	22
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de qPCR para determinar a cinética de expressão dos genes <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i> durante a interação arroz-nematoide.....	25
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i> e clonagem nos vetores pEzs-NL e pEzs-CL.....	28
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados para inserção dos efetores <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i> em vetor binário pC5300-OE por meio de recombinação através do sistema Gateway [®]	29
Tabela 5. Sequências selecionadas para produzir construções de amiRNAs para silenciamento dos genes <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	32
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para produção de amiRNAs a partir do <i>Osa-MIR528</i> , de acordo com esquema apresentado na Figura 7.....	33
Tabela 7. <i>Primers</i> usados para inserção de bordas AttB nas sequências dos amiRNAs para recombinação em vetor binário pC5300-OE.....	34
Tabela 8. <i>Primers</i> utilizados nas reações de qPCR para determinar do número de cópias das plantas T0.....	37
Tabela 9. Estimativa do número de cópias nas plantas transgênicas de arroz T0 por qPCR.....	38
Tabela 10. Dados das proteínas efetoras isoladas no trabalho de Huang e colaboradores (2003).	40
Tabela 11. Construções utilizadas para a transformação genética de arroz, código de cada construção, data da transformação e número de plantas aclimatadas em casa de vegetação.....	47
Tabela 12. Análise de Southern Blot do número de cópias do transgene inserido no genoma de plantas de arroz transformadas com as construções MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6, MB8 e MB10.	49
Tabela 13. Análise de qPCR do número de cópias do transgene inserido no genoma de plantas de arroz transformadas com as construções MB7 e MB9.....	50

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de um nematoide formador de galhas (NFG).....	12
Figura 2. Representação esquemática da região anterior de um J2 pré-parasita.	14
Figura 3. Infecção de arroz (<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare) por <i>M. graminicola</i>	16
Figura 4. Infecção de plantas de arroz (<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare) por <i>M. incognita</i>	17
Figura 5. Ensaio de infecção de <i>O. sativa</i> por <i>M. incognita</i>	24
Figura 6. Vetores para criação de fusões N- e C-terminais com GFP.....	27
Figura 7. Esquema dos vetores utilizados para obtenção de plantas de arroz transgênicas para superexpressão das proteínas <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	31
Figura 8. Representação da estrutura secundária <i>Osa-MIR528</i>	32
Figura 9. Esquema de PCR para produzir construções de amiRNAs a partir do <i>Osa-MIR528</i>	33
Figura 10. Esquema dos vetores utilizados para obtenção de plantas de arroz transgênicas para silenciamento dos genes <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	35
Figura 11. Resultados da análise realizada no programa SignalP para predição da presença de peptídeo sinal e da sua posição de clivagem nas proteínas <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	41
Figura 12. Curva de dissociação do produto da amplificação dos genes de <i>M. incognita</i> <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	42
Figura 13. Cinética de expressão dos genes <i>MSP2</i> , <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i> durante a interação arroz-nematoide.....	43
Figura 14. Sinal de fluorescência emitida pela GFP em células da epiderme de cebola transformadas com os vetores pEVS-CL e pEVS-NL (GFP livre).	44
Figura 15. Localização subcelular do efetor de <i>M. incognita</i> <i>MSP2</i>	45
Figura 16. Localização subcelular dos efetores de <i>M. incognita</i> <i>MSP7</i> e <i>MSP18</i>	46
Figura 17. Reprodutibilidade dos resultados da transformação de células da epiderme de cebola com as construções pEVS-NL- <i>MSP2</i> , pEVS-NL- <i>MSP7</i> e pEVS-NL- <i>MSP18</i>	46
Figura 18. Transformação genética de arroz mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
Figura 19. Membranas de Southern Blot das plantas transgênicas de arroz transformadas com as construções MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6 MB8 e MB10.	51

Resumo

Nematoides formadores de galhas (NFG) (*Meloidogyne* spp.) são endoparasitas biotróficos que possuem uma ampla gama de hospedeiros. O sucesso do parasitismo dos NFG depende da indução e manutenção de sítios de alimentação altamente especializados que são compostos por células gigantes. Os NFG produzem uma série de proteínas nas glândulas secretoras e as injetam, via estilete, nas células da planta hospedeira para manipular o seu metabolismo. Elucidar o papel das proteínas secretadas é essencial para o entendimento das bases moleculares do processo de parasitismo dos nematoides, bem como para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle destes parasitas. Este trabalho é o início de uma análise detalhada sobre o papel que três proteínas efetoras de *M. incognita*, *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*, desempenham na interação com arroz (*Oryza sativa*). Os genes de parasitismo de *M. incognita* *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* codificam para proteínas de 210, 176 e 172 aminoácidos, respectivamente, são expressos nas glândulas secretoras do nematoide e possuem peptídeo sinal de secreção na extremidade N-terminal. A análise de expressão através de qRT-PCR mostrou que estes genes apresentam diferentes padrões de expressão durante interação planta-nematoide, sendo que *MSP2* tem seu pico de expressão na fase inicial de estabelecimento do parasitismo, enquanto *MSP7* e *MSP18* são expressos ao longo de todo o ciclo de parasitismo. Resultados de experimentos de transformação transiente de células da epiderme de cebola, via biobalística, mostraram que o produto da fusão *MSP2*-EGFP apresentou forte sinal de fluorescência no núcleo, enquanto que os produtos das fusões *MSP7*-EGFP e *MSP18*-EGFP mostraram sinal de fluorescência no citoplasma e no núcleo da célula vegetal. Estes resultados mostram que estas proteínas são direcionadas a diferentes compartimentos subcelulares da célula vegetal. Foram obtidas plantas transgênicas de arroz (*O. sativa* cv. Nipponbare) expressando as proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*, sem o peptídeo sinal de secreção, e micro-RNAs artificiais (amiRNAs) capazes de silenciar a expressão dos genes correspondentes no nematoide. Para cada gene estudado, dois amiRNAs foram selecionados. Para cada construção uma média de 24 plantas transgênicas foram obtidas. Análises de Southern-blot and qPCR foram realizadas para identificar plantas T0 com apenas uma cópia do transgene e para cada construção foram selecionadas três linhagens T1 para avanço de geração e, posterior, realização de bioensaios. A análise do processo de infecção das plantas transgênicas por *M. incognita* irá permitir a identificação de genes essenciais para o estabelecimento do parasitismo. Os dados obtidos nestas análises irão ampliar o conhecimento sobre as proteínas efetoras de fitonematoides e trazer novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias de controle de *Meloidogyne* spp. em arroz e outras culturas de interesse.

Abstract

Root-knot nematodes (RKN) (*Meloidogyne* spp.) are endo-parasites with a wide host range. Effector proteins, produced in the nematode esophageal gland cells and released in the host plant cells through stylet, dramatically modify selected plant cells into giant-cells, which are the permanent food source to the sedentary nematode. Elucidating the role of different nematode effectors is essential to understanding the molecular basis of nematode parasitism as well as to developing new nematode control strategies. This study is the beginning of an extensive analysis to assess the functional role of three *M. incognita* effector proteins, *MSP2*, *MSP7* and *MSP18*, during rice-nematode interaction. The coding sequence of *MSP2*, *MSP7* and *MSP18* encoded proteins with 210, 176 e 172 amino acids, respectively, including N-terminal signal peptides. These genes are expressed exclusively in the nematode esophageal gland cells. qPCR analysis of transcript accumulation showed that *MSP2*, *MSP7* and *MSP18* genes displayed different expression patterns during host infection. *MSP2* reaches the maximum expression level in the beginning of parasitism cycle. *MSP7* and *MSP18* are highly expressed during the whole parasitism cycle. To test the localization of *MSP2*, *MSP7* and *MSP18* in plant cells, a protein transient expression assay was performed. The fusion product of *MSP2*-GFP showed a strong fluorescence signal in plant nuclei, while the fluorescence signal of the *MSP7*-GFP and *MSP18*-GFP fusion products were observed in plant cytoplasm and nuclei. Reverse and forward genetic analyses were conducted to assess the role of the candidate proteins in plant-nematode interactions. We used rice (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) to generate transgenic plants expressing *MSP2*, *MSP7* and *MSP18* full-length cDNAs or artificial micro-RNAs (amiRNAs) able to silence the cognate genes in the nematode. For each gene studied, two amiRNAs were selected to perfectly match the *M. incognita* candidate gene but not other nematode or plant sequences. For each construct, an average of 24 plants was recovered. Southern-blots and qPCR analyses identified single-copy gene (or amiRNA) constructs insertion in the genome of the transformed plants (T0 plants). Assessment of nematode growth and development on transgenic plants will allow selecting genes involved in establishing the compatibility with the host plant. Data obtained should significantly widen our knowledge of molecular players contributing to nematode pathogenicity, opening new avenues for *Meloidogyne* spp. control strategies in rice and other crops of interest which are highly susceptible to *M. incognita*.

1. Introdução

Nematoides parasitas de plantas, ou fitonematoides, são parasitas biotróficos e estão entre as principais pragas da agricultura em todo o mundo. Os fitonematoides podem ser divididos em dois grandes grupos: sedentários e migratórios. Nematoides parasitas migratórios permanecem móveis durante todas as fases do desenvolvimento e se alimentam em diferentes células da planta hospedeira, levando-as rapidamente a morte. Pertencem a este grupo endoparasitas dos gêneros *Pratylenchus* e *Radopholus*, e ectoparasitas dos gêneros *Longidorus* e *Belonolaimus*. Nematoides parasitas sedentários, após uma fase migratória inicial, infectam a raiz da planta hospedeira e estabelecem sítios de alimentação especializados onde se alimentam ao longo do seu desenvolvimento. O grupo dos sedentários inclui os gêneros de maior importância econômica, como nematoides formadores de galha (NFG) (*Meloidogyne*) e nematoides formadores de cisto (NFC) (*Heterodera* e *Globodera*), dentre outros (*Rotylenchulus*, *Nacobbus* e *Tylenchulus*) (Bakhetia *et al.*, 2005; Williamson e Gleason, 2003).

Os NFG estão entre os patógenos de plantas de maior importância econômica na agricultura. Dentre estes, *Meloidogyne incognita* se destaca como uma das espécies mais amplamente distribuídas, sendo encontrada em todas as regiões onde ocorre temperatura mínima de até 3 °C. Este fitonematoide ataca mais de 1700 espécies vegetais, incluindo a maioria das plantas cultivadas (Huang *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2008).

O ciclo de vida de NFG consiste em três estádios: ovo, juvenil (subdividido em juvenil 1 [J1], juvenil 2 [J2], juvenil 3 [J3] e juvenil 4 [J4]) e adulto (Figura 1). Os diferentes estádios são separados por ecdises, quando ocorre a substituição da cutícula. Um ciclo completo de parasitismo de um NFG leva de 3 a 6 semanas, dependendo das condições ambientais. O J2 é o único estágio infectivo do nematoide. No solo o J2 eclode do ovo, migra até a raiz da planta hospedeira, penetra pela zona de alongação da raiz e se desloca pelo espaço intercelular até o cilindro vascular em fase de diferenciação. Nesta região, o J2 seleciona um grupo de células parenquimáticas e induz a transformação destas células em um

sítio de alimentação altamente especializado, chamado galha. As galhas são compostas por de 5 a 7 células, denominadas células gigantes (Abad e Williamson, 2010).

A formação das células gigantes se dá por meio da indução, nas células selecionadas pelo nematoide, de repetidas mitoses sem a ocorrência de citocinese. As células gigantes são hipertrofiadas, multinucleadas e com citoplasma denso, contendo inúmeras organelas e com vacúolo fragmentado (de Almeida Engler e Gheysen, 2013).

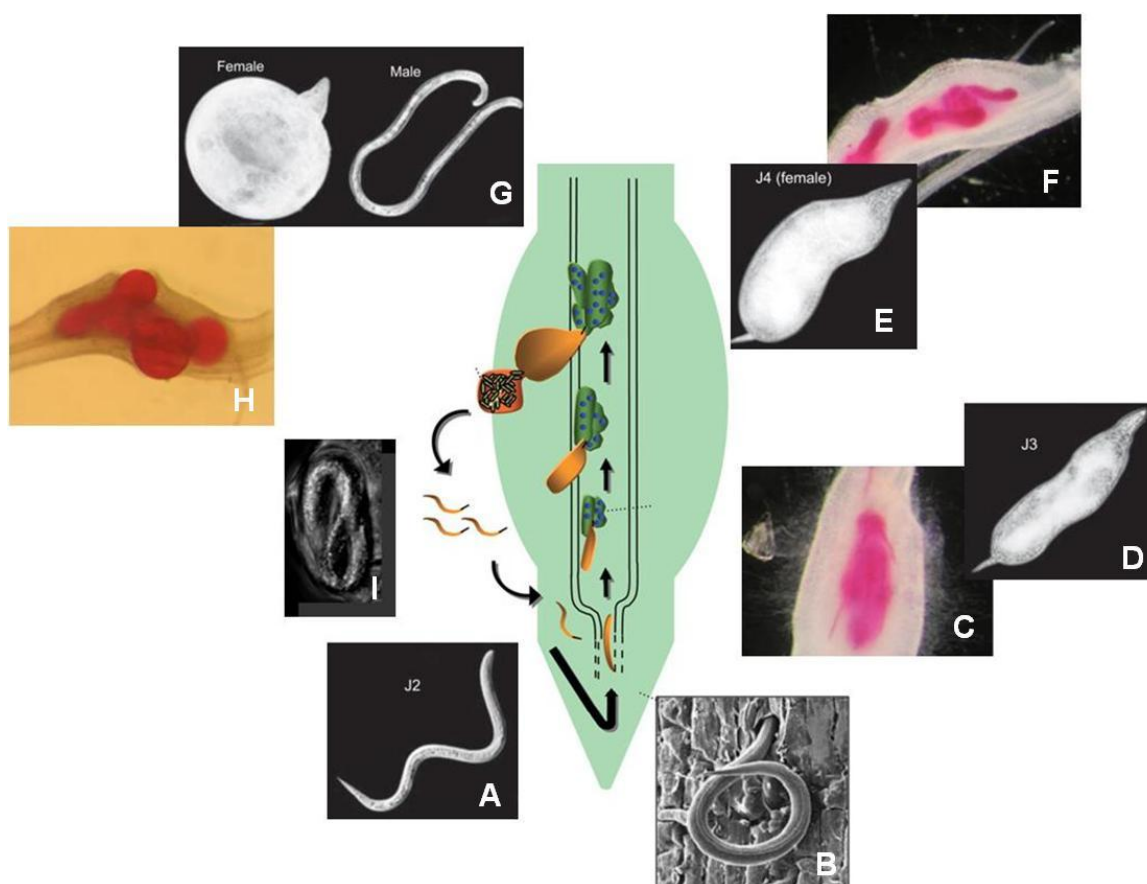


Figura 1. Ciclo de vida de um nematoide formador de galhas (NFG).

O J2 pré-parasita penetra na raiz da planta hospedeira (A e B) e migra entre as células até alcançar o cilindro vascular em fase de diferenciação, onde induz a formação do sítio de alimentação. Uma vez estabelecido o sítio de alimentação o J2 se torna sedentário e passa pelos estádios J3 e J4 (C, D, E e F), tornando-se adulto. Em condições favoráveis o J4 se diferencia em fêmea e em condições desfavoráveis em macho (G). Ao final do ciclo a fêmea deposita ovos na parte externa da raiz (H). A embriogênese e a ecdise do J1 ocorrem no ovo (I). Fonte: adaptado de Abad e colaboradores (2008) e Abad e Williamson (2010).

Uma vez estabelecido o sítio de alimentação, o J2 se torna sedentário e passa pelos estádios J3 e J4, tornando-se adulto. Em condições favoráveis os J4

se diferenciam em fêmeas e em condições desfavoráveis em machos. Os machos são vermiformes, móveis e deixam a raiz logo após a quarta ecdise. As fêmeas são piriformes, sedentárias e produzem ovos no final do ciclo (Abad e Williamson, 2010).

A reprodução de *M. incognita* se dá exclusivamente por partenogênese mitótica, o que pode estar relacionado com a ampla gama de hospedeiros que a espécie apresenta (Trudgill, 1997). Os ovos são depositados pela fêmea na parte externa da raiz, protegidos por uma matriz gelatinosa. A embriogênese dentro do ovo é seguida pela ecdise do J1, produzindo o J2 que eclode no solo e dá início a um novo ciclo de parasitismo (Abad e Williamson, 2010).

1.1. Proteínas efetoras

As mais notáveis adaptações dos nematoides ao parasitismo de plantas são o estilete e as glândulas secretoras (Hussey, 1989; Baldwin *et al.*, 2004, Davis *et al.*, 2004) (Figura 2). O estilete é uma espécie de agulha retrátil localizada na cavidade oral do fitonematoide que é utilizada para perfurar, injetar secreções e retirar os nutrientes das células da planta hospedeira. As glândulas secretoras, duas subventrais e uma dorsal, consistem em três grandes e complexas células onde são produzidas as secreções injetadas pelos fitonematoides na planta hospedeira via estilete. As glândulas subventrais do nematoide são mais ativas nos estádios iniciais do parasitismo, que compreendem a penetração na raiz, migração e indução do sítio de alimentação. A glândula dorsal é mais ativa na fase sedentária, quando o sítio de alimentação já está estabelecido, até final do ciclo de parasitismo (Hussey, 1989).

As secreções do estilete dos fitonematoides consistem, entre outros compostos, de uma série de proteínas, conhecidas como proteínas efetoras. São considerados efetores todas as proteínas e pequenas moléculas do patógeno que alteram a estrutura e função das células do hospedeiro (Hogenhout *et al.*, 2009). As proteínas efetoras têm papel fundamental para o sucesso do parasitismo dos fitonematoides (Vanholme *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2008; Rosso *et al.*, 2012).

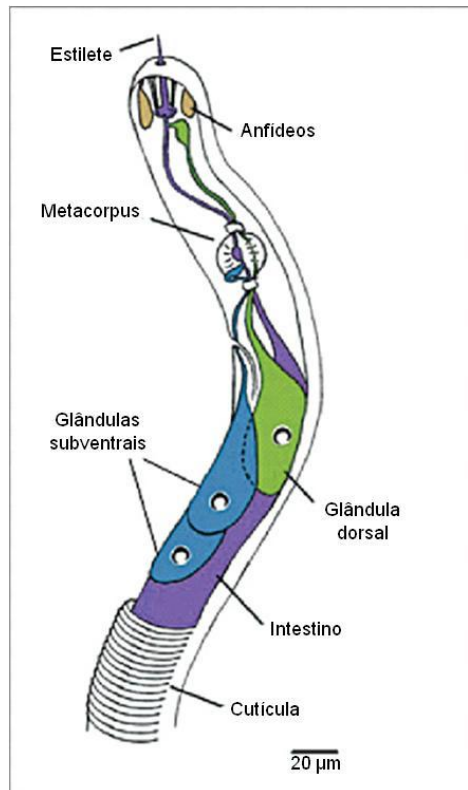


Figura 2. Representação esquemática da região anterior de um J2 pré-parasita.

Os órgãos mais importantes estão indicados. Fonte: adaptado de Vanholme e colaboradores (2004).

Com o objetivo de isolar e identificar proteínas efetoras de *M. incognita*, diferentes estratégias moleculares têm sido aplicadas, tendo como alvo principal as três glândulas secretoras do nematoide. Huang e colaboradores (2003) construíram uma biblioteca de cDNA a partir do conteúdo de glândulas secretoras microaspiradas de *M. incognita*. Combinando a análise em larga escala de ESTs desta biblioteca, identificação de cDNAs que codificavam proteínas com um peptídeo de exportação na extremidade N-terminal e de hibridização *in situ* de alto rendimento em diferentes estádios de desenvolvimento do nematoide, eles identificaram 37 genes candidatos a efetores de *M. incognita*, sendo que 70% codificam para proteínas pioneiras. Uma abordagem baseada em técnicas de proteômica foi empregada por Bellafiore e colaboradores (2008) que identificaram, por meio de espectrometria de massa, 486 proteínas secretadas por *M. incognita*. Juntamente com estes estudos, o sequenciamento do genoma de *M. incognita* (Abad *et al.*, 2008) fornece uma plataforma de pesquisa que abre a possibilidade

de identificação do repertório completo de potenciais proteínas envolvidas no parasitismo.

As primeiras proteínas efetoras descritas em fitonematoides foram celulases de NFC (Smant *et al.*, 1998), e desde então mais de 100 genes de parasitismo foram clonados e as funções e alvos no hospedeiro de algumas proteínas efetoras tem sido elucidadas (Rosso *et al.*, 2012). Dentre as principais funções das proteínas efetoras pode-se destacar a modificação da parede celular e a interferência na atividade biológica normal das células do hospedeiro e a manipulação das defesas da planta (revisado por Abad e Williamson, 2010; Haegeman *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012; Hewezi e Baum, 2013).

1.2. Interação arroz-nematoide

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos principais alimentos básicos para a humanidade e os fitonematoides são patógenos que causam prejuízos significativos à produção deste cereal. As espécies de nematoide parasitas que atacam arroz variam conforme a região e o sistema de cultivo. *Aphelenchoides besseyi*, o agente causador da doença dos ponteiros brancos, aparece em todos os sistemas de cultivo. Em sistema de cultivo alagado os fitonematoides *Ditylenchus angustus* e *Meloidogyne graminicola* são as espécies predominantes, enquanto que *Hirschmanniella* spp. estão presentes em sistemas de cultivo irrigado. Em cultivos de terras altas *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. têm o maior potencial causador de dano (de Waele e Elsen, 2007).

M. graminicola é a espécie de NFG que causa os maiores prejuízos para o cultivo do arroz. O ciclo de vida deste parasita apresenta poucas diferenças quando comparado ao ciclo de vida de outros NFG. Basicamente, o J2 penetra na planta hospedeira na região próxima a ponta da raiz, onde promove a formação das células gigantes e se desenvolve. O ciclo se completa em 19 dias a uma temperatura entre 22–29 °C. As fêmeas depositam os ovos dentro da raiz. Os J2 eclodem dos ovos dentro da raiz e podem permanecer na mesma galha ou migrar dentro da mesma raiz e promover a formação de novos sítios de alimentação (Haegeman *et al.*, 2012) (Figura 3).

O fato do ciclo de vida deste parasita se dar inteiramente dentro da raiz da planta hospedeira se trata, possivelmente, de uma adaptação aos sistemas de produção de arroz alagado, uma vez que, neste sistema, se o J2 migrar para fora da raiz ele é incapaz de invadi-la novamente.

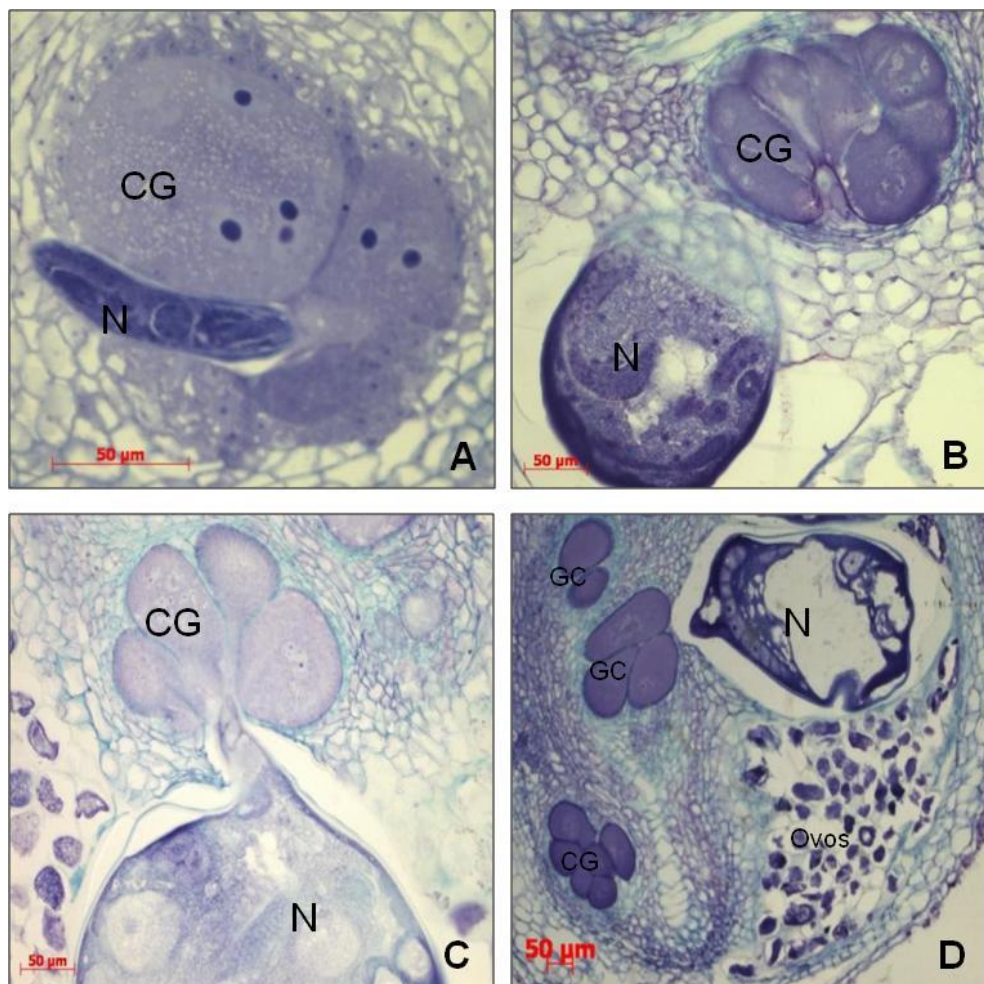


Figura 3. Infecção de arroz (*O. sativa* cv. Nipponbare) por *M. graminicola*. (A) 7 d.a.i. (dias após a infecção); (B) 14 d.a.i.; (C) 22 d.a.i.; (D) 31 d.a.i.. CG=células gigantes, N=nematoide, Ovos=ovos depositados pela fêmea no interior da raiz da planta hospedeira. Fonte: arquivo pessoal¹.

Os dados do genoma de *M. graminicola* ainda não estão disponíveis e apenas recentemente foi publicado um estudo que busca, através da análise do transcrito, a identificação de genes candidatos a efetores deste nematoide

¹ Estas imagens foram realizadas no INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UMR 1355 ISA, França, em colaboração com a pesquisadora Dra. Janice de Almeida Engler, e são parte da pesquisa iniciada no IRD (Institut de Recherche pour le Développement), UMR 186 RPB, pela aluna de mestrado Aurélie Bak (2010), da Universidade de Strasbourg, França.

(Haegeman *et al.*, 2012). Por outro lado, o genoma de *M. incognita* já foi inteiramente sequenciado e os dados publicados (Abad *et al.*, 2008), e com a disponibilidade do genoma do arroz já há alguns anos (Goff *et al.*, 2002), estas espécies se tornam fortes candidatas para estudos da interação entre monocotiledôneas e NFG. Estudos prévios mostram a compatibilidade da interação *M. incognita* e plantas de arroz da variedade Nipponbare (Bak, 2010) (Figura 4).

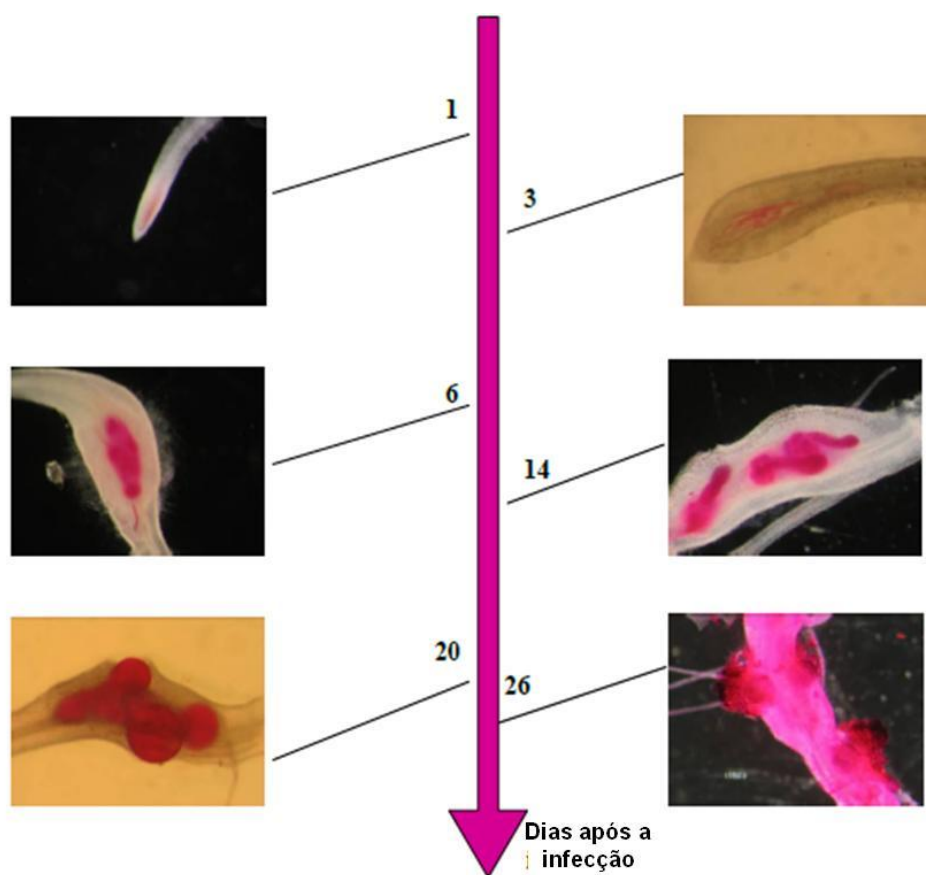


Figura 4. Infecção de plantas de arroz (*O. sativa* cv. Nipponbare) por *M. incognita*. Durante a interação compatível, os nematoides penetram na ponta raiz da planta de arroz, migram pelo espaço intercelular, estabelecem o sítio de alimentação e se reproduzem. Imagens realizadas em microscópio com aumento de 20x e 50x nos períodos de 1, 3, 6, 14, 20 e 26 dias após a infecção. Os nematoides foram corados com fucsina. Fonte: adaptada de Bak (2010).

Além disso, em comparação com o conhecimento existente no processo de infecção de dicotiledôneas por nematoides parasitas sedentários, pouco se sabe sobre a interação destes parasitas com monocotiledôneas (Nahar *et al.*, 2013), o que torna este um campo de estudo repleto de oportunidades.

1.3. Contexto de desenvolvimento do trabalho

O grupo de pesquisa do LIMPP (Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) vem, há algum tempo, desenvolvendo pesquisas sobre a interação planta-nematoide e na validação de genes para controle desta praga.

Foram publicados pelo grupo o isolamento e caracterização de cDNA codificador de uma serina proteinase de *M. incognita* (Fragoso *et al.*, 2005) e de uma proteinase aspártica tipo catepsina-D de *M. incognita* (Fragoso *et al.*, 2009), possivelmente envolvidas na interação planta-nematoide.

Ainda com relação à interação planta-nematoide, foram construídas bibliotecas de ESTs a partir de uma variedade de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) resistente e de uma variedade suscetível, infectadas por *M. incognita*. A análise destas bibliotecas mostrou que 20 genes são expressos exclusivamente na variedade de algodão resistente a *M. incognita*, com funções previstas de reconhecimento do patógeno, transdução de sinal, mecanismos de defesa da planta e síntese, transporte e ativação de proteínas (de Deus Barbosa *et al.*, 2009).

Estudos em plantas transgênicas de soja (*Glycine max*) e fumo (*Nicotiana tabacum*) expressando dsRNAs para genes essenciais do metabolismo de *M. incognita* mostraram resultados promissores no controle desta praga. As progênies T2 de plantas transgênicas de soja desafiadas com *M. incognita* raça 1, mostraram redução de até 90% no número de ovos por grama de raiz em comparação com o controle (Ferreira, 2012). Plantas transgênicas de fumo expressando dsRNA para os genes codificadores da isocitrato liase e HSP90 apresentaram redução em torno de 50% no número de ovos por grama de raiz, em comparação com o controle (Lourenço *et al.*, em preparação).

Em ensaios de infecção de plantas de fumo expressando dsRNA para o silenciamento da expressão de três genes que expressam proteases de classes catalíticas diferentes (Mi-asp-1, Mi-ser-1 e Mi-cpl-1) de *M. incognita* foi observada

redução da taxa de fecundidade dos nematoides, bem como redução da taxa de eclosão e da capacidade de infecção da progênie (Souza Jr, 2011).

Na pesquisa de Souza (2008) foram isolados e clonados quatro genes de *M. incognita*, 2E07 (MSP1), 2G02 (MSP2), 7E12 (MSP7) e 17H02 (MSP18), previamente descritos como possíveis efetores de parasitismo por Huang e colaboradores (2003).

A análise funcional da proteína efetora 7E12 (MSP7) de *M. incognita* mostrou que esta é expressa na glândula dorsal do nematoide e que a superexpressão em plantas de fumo leva à aceleração da formação do sítio de alimentação (Souza *et al.*, 2011). A análise da proteína 2E07 (MSP1), secretada por *M. incognita*, mostrou que a superexpressão em plantas de fumo também leva à aceleração da formação do sítio de alimentação (Grossi de Sá, 2011).

No ano de 2010, os genes 2G02 (MSP2), 7E12 (MSP7) e 17H02 (MSP18), foram incluídos no projeto “Identification of nematode (*Meloidogyne* spp.) effectors of pathogenicity in rice (*Oryza sativa*)”, atualmente em andamento entre o LIMPP (Embrapa-Cenargen, Brasil), a UMR 116 (IRD - Institut de Recherche pour le Développement, França) e o IITA (International Institute of Tropical Agriculture, Benin).

Criado em 1944, o IRD (Institut de Recherche pour le Développement) é um órgão público francês, sob tutela dos Ministérios da Pesquisa e da Cooperação da França, voltado ao desenvolvimento de países tropicais parceiros. Suas pesquisas estão focadas nas relações entre o homem e seu meio ambiente e estão distribuídas em seis grandes áreas: luta contra a pobreza, migrações, doenças emergentes, mudanças climáticas e riscos naturais, acesso à água e ecossistemas. No departamento “Recursos vivos”, o laboratório “Resistência das Plantas aos Bioagressores” (UMR 186) é composto de pesquisadores do IRD, do Cirad e da Universidade de Montpellier II. As pesquisas desenvolvidas na UMR 186 estão relacionadas basicamente com melhoramento genético de plantas para uma resistência duradoura aos parasitas. Os objetivos do laboratório são identificar e compreender os mecanismos fisiológicos, moleculares e genéticos envolvidos nas interações planta-patógeno. Os modelos

de estudo são plantas de interesse agrônomo, essenciais para os países tropicais, como o café, o arroz e o algodão.

O projeto entre o LIMPP e a UMR 186 prevê o intercâmbio de alunos e pesquisadores entre os países envolvidos e foi no âmbito de desenvolvimento deste projeto que este trabalho de dissertação foi desenvolvido. O grupo de nematologia da UMR 186 desenvolve pesquisas sobre a virulência de *Meloidogyne* spp. usando o arroz como planta modelo. Em Montpellier, este grupo tem parceria com a plataforma de transformação genética do arroz REFUGE (Rice FUnctional GENomics platform). Refuge é uma plataforma financiada pela fundação Agropolis, sediada no CIRAD (Centre de coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement). Esta plataforma abriga projetos da comunidade científica local e internacional, oferecendo acesso a ferramentas de bioinformática, recursos biológicos, recursos moleculares e *know-how* para os cientistas que desejam usar o arroz como um sistema modelo para elucidar a função de genes através de estratégias de genômica funcional.

O trabalho apresentado aqui foi desenvolvido no laboratório da UMR 186 e na plataforma REFUGE.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar o papel funcional das proteínas efetoras de *M. incognita* *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* e sua potencial aplicação no controle de fitonematoides.

2.2. Objetivos específicos

Analisar a cinética de expressão dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* durante a interação arroz-*M. incognita*.

Identificar a localização subcelular das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* em células vegetais.

Transformar geneticamente plantas de arroz para expressão das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*.

Transformar geneticamente plantas de arroz para expressão de micro-RNAs para silenciamento dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*.

Caracterizar as plantas T0 quanto ao número de cópias do transgene inserido no genoma.

Obter a geração T2 das linhagens selecionadas.

3. Material e métodos

3.1. Isolamento e clonagem dos genes candidatos²

As sequências dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* foram amplificadas por PCR com *primers* específicos (Tabela 1), desenhados com base nas sequências disponíveis para estes genes no banco de dados “*Meloidogyne incognita* resources”

(http://www.inra.fr/meloidogyne_incognita/sequencing/consortium__1).

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* e clonagem em vetor pGEM[®]-T Easy.

Primer	Sequência (5'-3')
Mi- <i>MSP2</i> -F	ATGAATTTATTTTCTATTTTTTTTATT
Mi- <i>MSP2</i> -R	TTACAATTTAGCATGAATCTTAAC
Mi- <i>MSP7</i> -F	ATGGCGGCTCTCCTCTTC
Mi- <i>MSP7</i> -R	TTAAACAGTATTAGCTCTTCCACCAC
Mi- <i>MSP18</i> -F	ATGGCCATCCTCTTTACTTCTAC
Mi- <i>MSP18</i> -R	TTAGTTCATCATATTTTTGTCATGG

Para os genes *MSP7* e *MSP18*, que não possuem íntrons, a amplificação por PCR foi feita a partir de 20 ng de DNA genômico de *M. incognita*. O gene *MSP2* foi amplificado a partir de 5 µl de cDNA de J2 de *M. incognita* (cDNA na diluição de 1:10, sintetizado a partir de 1 µg de RNA total de J2). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl com a enzima Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs[®], Inc.) (0,5 U), Phusion High-Fidelity Buffer (1x), primer sense (500 nM), primer antisense (500 nM) e dNTPs (0,5 mM). A PCR foi programada para uma etapa de desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, 30 ciclos de amplificação (98 °C 10 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s) e uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 0,8% e o fragmento correspondente a cada gene foi extraído do gel e purificado com o

² O isolamento e clonagem dos genes, bem como as etapas de construção dos vetores para superexpressão das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP7* e de construção dos vetores para silenciamento destes genes, foi um trabalho realizado pela Dra. Magda Beneventi durante a realização do Pós-doc no IRD - Institut de Recherche pour le Développement, UMR 186 "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs", no ano de 2011.

QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN[®]). Os fragmentos purificados, após a adição de uma cauda poli-A nas extremidades, foram ligados em pGEM[®]-T Easy (Promega) usando a T4 DNA Ligase (Promega).

O produto da ligação foi utilizado para transformação de células termocompetentes de *Escherichia coli* TOP 10. Foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias que cresceram no meio seletivo com o PureYield[™] Plasmid Miniprep System (Promega), e a análise dos clones transformantes foi realizada por digestão (*MSP7* e *MSP18*) ou PCR (*MSP2*) e por sequenciamento (Beckman Coulter Genomics, United Kingdom).

3.2. Cinética de expressão dos genes candidatos durante a interação arroz - *M. incognita*³

3.2.1. Cultura e coleta de *M. incognita* raça 1

A manutenção da linhagem e a produção de inóculo de *M. incognita* raça 1 foi feita em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.).

Para coleta de juvenis pré-parasitas (J2), raízes de tomateiro infectadas com *M. incognita* foram retiradas dos vasos e lavadas com água corrente. Em seguida, as raízes foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio 6,7% (v/v) por 3 min e esta solução foi separada em peneiras de 250, 120 e 25 µm para coleta de ovos. Os ovos coletados na peneira de 25 µm foram colocados em um tubo falcon de 50 ml com hipoclorito de sódio 6,7% (v/v) e uma gota de Tween 20. A mistura foi agitada por inversão por 10-15 min e novamente separada em peneira de 25 µm. Os ovos coletados na peneira de 25 µm foram lavados com água destilada para total remoção hipoclorito de sódio e dispostos em um sistema de eclosão *in vitro*.

Este sistema consiste de vasilhas com água destilada que apoiam peneiras forradas com dupla camada de papel toalha onde os ovos coletados são

³ O ensaio de infecção de arroz por *M. incognita*, a coleta das amostras de pontas de raízes e galhas e a preparação do cDNA foram realizados pela aluna de Mestrado Aurélie Bak no IRD - Institut de Recherche pour le Développement, UMR 186 "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs", no ano de 2010.

depositados. Espontaneamente, os ovos se desenvolvem e os juvenis de segundo estágio (J2) eclodem, migrando do papel toalha para a vasilha e sedimentando no fundo do recipiente.

3.2.2. Ensaio de infecção de *O. sativa* por *M. incognita*

Sementes de arroz da variedade Nipponbare foram germinadas em placas de Petri contendo areia umedecida com água destilada (Figura 5A). Depois de sete dias as plântulas de arroz foram transferidas para a câmara de inoculação onde permaneceram por dois dias (Figura 5B) e foram então inoculadas com 400 J2 de *M. incognita* (Figura 5C). Para sincronizar a infecção, 24 horas após a inoculação as plântulas tiveram as raízes lavadas e foram transferidas para um sistema de cultivo hidropônico com solução Hoagland (Figura 5D). As plântulas foram cultivadas em câmara de crescimento sob as seguintes condições: fotoperíodo de 14h/10h luz/escuro, temperatura de 26°C/24°C dia/noite, luminosidade de 100 klux e umidade constante de 78%.

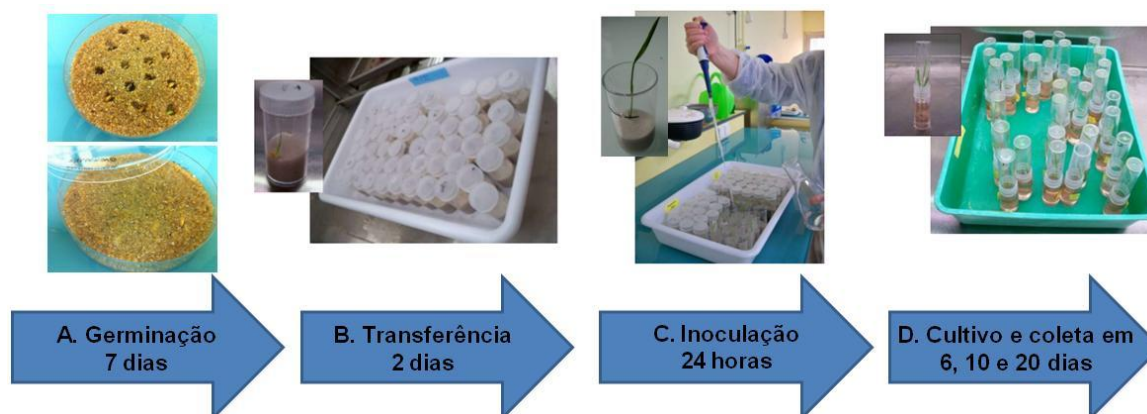


Figura 5. Ensaio de infecção de *O. sativa* por *M. incognita*.

Etapas do ensaio de infecção de *O. sativa* por *M. incognita* a fim de determinar a cinética de expressão dos genes candidatos *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* durante a interação planta-nematoide. (A) Germinação das sementes de arroz em placas de Petri contendo areia umedecida. (B) Transferência das plântulas para a câmara de inoculação, onde elas permaneceram por dois dias antes de serem inoculadas. (C) Inoculação das plântulas com 400 J2 de *M. incognita*. (D) Transferência das plântulas, 24 horas depois da inoculação, para um sistema de cultivo hidropônico onde elas permaneceram até a coleta.

Pontas de raízes e galhas foram coletadas 6, 10 e 20 dias após a inoculação para extração de RNA total e síntese de cDNA. Para cada tempo de análise foram coletadas três amostras, cada uma composta por galhas e pontas de raízes de cerca de 10 plantas.

3.2.3. Extração de RNA total

RNA total das raízes de arroz infectadas com *M. incognita* e RNA total de J2 de *M. incognita* foi extraído utilizando o RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN[®]), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA obtido foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% e a quantificação foi feita em Nanodrop[®]. As amostras de RNA foram armazenadas a -80 °C.

3.2.4. Reação de transcrição reversa

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando Omniscript[®] Reverse Transcription kit (Qiagen[®]), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C.

3.2.5. PCR quantitativa (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas num termociclador MX3005P (Stratagene, LaJolla, Califórnia, EUA). Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações de qPCR para determinar a cinética de expressão dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* durante a interação arroz-nematoide.

Primer	Sequência (5'-3')
Mi- <i>MSP2</i> -F	GGGGAAAATACTGCGAGAATG
Mi- <i>MSP2</i> -R	TGCCGCTGTTATAGTTGTGG
Mi- <i>MSP7</i> -F	CCCTGGTTGTATGCAGGTTG
Mi- <i>MSP7</i> -R	GCCCAGCTACTTGTAATGTCAC
Mi- <i>MSP18</i> -F	ATACTCCCGGAGGAAAGCAT
Mi- <i>MSP18</i> -R	ATGGGACTGTCCATCGACTT
β-actin-F	GCTTTGCTATGTTGCTTTGG
β-actin-R	TGTAAGAAGTCTCGTGAATACC

As reações de qRT-PCR foram realizadas em volume final de 15 µl com Sybergreen® 1x, 10 µM de cada primer (sense e antisense) e 5 µl de cDNA (diluição 1:100). O programa usado foi o seguinte: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de amplificação (95 °C 15 s, 60 °C 20s, 72 °C 40s) e uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C.

A eficiência da reação de qRT-PCR foi calculada com o programa LinRegPCR (Ramakers *et al*, 2003). Este programa usa dados com linha de base não corrigida e calcula a partir deles a linha de base corrigida, bem como a janela de linearidade, e faz análise de regressão linear para ajustar uma linha reta através do conjunto de dados da qRT-PCR. A partir da inclinação desta reta a eficiência de amplificação de cada amostra individual é calculada.

Foi gerada a curva de dissociação dos produtos da PCR para testar a especificidade dos primers utilizados. A análise foi realizada a uma taxa de transição de temperatura linear de 0,1 °C s⁻¹ de 55 à 95°C com determinação contínua da aquisição da fluorescência.

As reações de qRT-PCR foram realizados em duplicata com a inclusão de um controle com adição de água no lugar do cDNA. Três replicatas biológicas foram analisadas por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise comparativa onde a expressão relativa dos genes de interesse foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), sendo que a expressão dos genes de interesse foi normalizada com a expressão do gene β -actina de *M. incognita* (Bak, 2010) e relativizada com a expressão no J2 pré-parasita.

3.3. Localização subcelular dos efetores em células vegetais

3.3.1. Vetores de expressão dos genes candidatos fusionados a GFP

Foram usados os vetores pEVS-NL e pEVS-CL (Ehrhardt Laboratory, Carnegie Institution for Science, Washington, EUA) para criar fusões N- e C-terminais dos genes candidatos com GFP. Os vetores pEVS consistem nos mesmos cassetes de expressão presentes nos vetores da série "T", porém, sem o

gene de seleção em plantas e sem as extremidades de transferência do T-DNA (Figura 6)

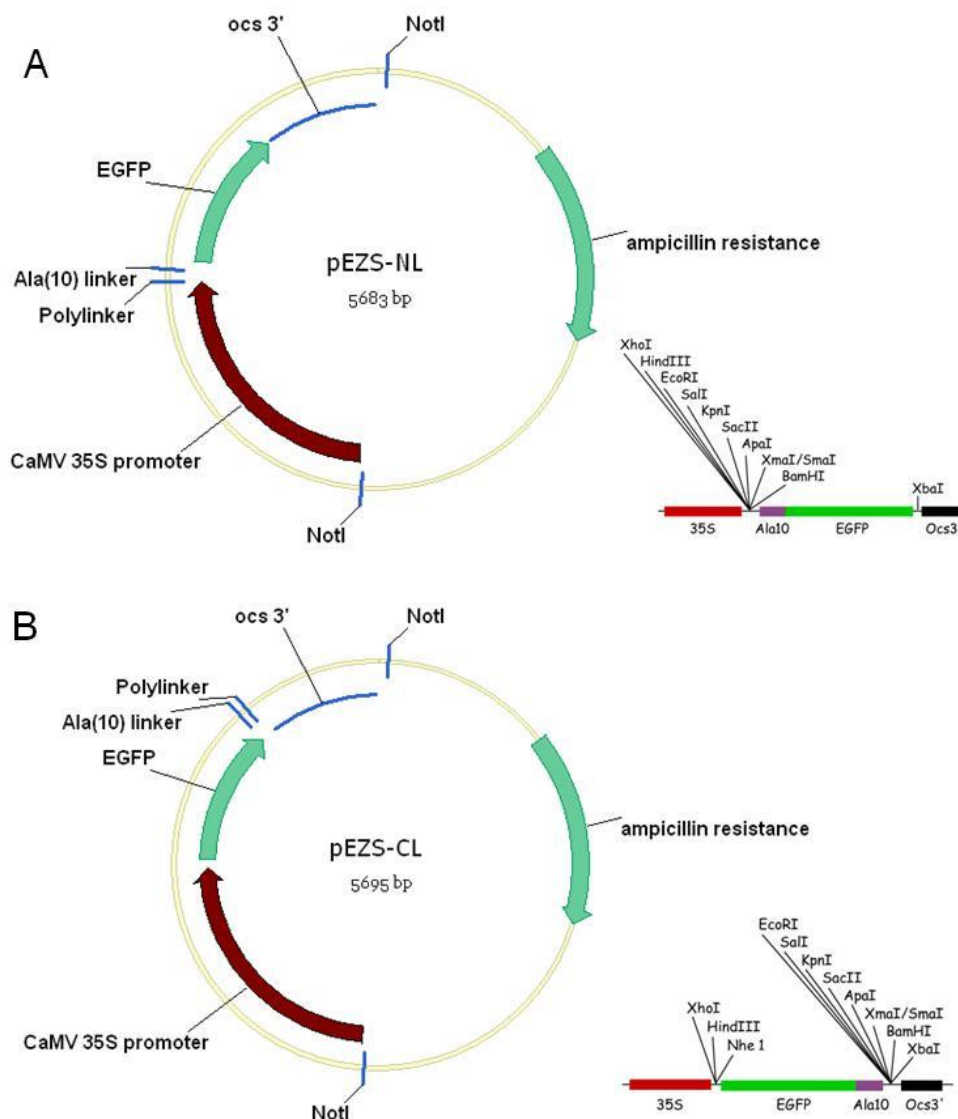


Figura 6. Vetores para criação de fusões N- e C-terminais com GFP.

Esquema dos vetores pEZS-NL (A) e pEZS-CL (B), compostos pelo promotor CaMV35S CaMV 35S promoter), pela EGFP, por uma sequência de 10 alaninas (Ala[10] linker), pelo sítio múltiplo de clonagem (polylinker), e pelo terminador Ocs3'. Os cassetes de expressão são flanqueados por sítios de restrição *NotI* para permitir a subclonagem fácil em outros vetores.

Os genes de interesse, sem peptídeo sinal de secreção, foram amplificados por PCR com os *primers* listados na Tabela 3. Os fragmentos amplificados por PCR foram digeridos com as enzimas apropriadas (*BamHI* e *KpnI* para *MSP2* e *BamHI* e *EcoRI* para *MSP7* e *MSP18*) e ligados nos vetores pEZS-NL e pEZS-CL com o Rapid DNA Ligation Kit (Roche), para criação dos vetores pEZS-NL-*MSP2*,

pEzs-CL-MSP2, pEzs-NL-MSP7, pEzs-CL-MSP7, pEzs-NL-MSP18 e pEzs-CL-MSP18.

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* e clonagem nos vetores pEzs-NL e pEzs-CL.

Primer	Sequência (5'-3')
CL-MSP2-F	CGGGGTACCTTGAATGCAGCGGAGATTGTTC
CL-MSP2-R	CGCGGATCCTTACAATTTAGCATGAATCTTAAC
CL-MSP7-F	CCGGAATTCACAGGCGATCGAAATGCATC
CL-MSP7-R	CGCGGATCCTTAAACAGTATTAGCTCTTC
CL-MSP18-F	CCGGAATTCTGAATACAGGCATTCCGAG
CL-MSP18-R	CGCGGATCCTTAAACAGTATTAGCTCTTC
NL-MSP2-F	CGGGGTACCTGAACCATGGAATGCAGCGGAGATTGTTC
NL-MSP2-R	CGCGGATCCGCAATTTAGCATGAATCTTAAC
NL-MSP7-F	CCGGAATTCTGAACCATGACAGGCGATCGAAATGCATC
NL-MSP7-R	CGCGGATCCGCAACAGTATTAGCTCTTCCAC
NL-MSP18-F	CCGGAATTCTGAACCATGGTGAATACAGGCATTCCGAG
NL-MSP18-R	CGCGGATCCGCGTTCATCATATTTTTGCATG

Células competentes de *E. coli* TOP10 foram transformadas com o produto da ligação e crescidas em meio LB com antibióticos. As colônias positivas foram verificadas por digestão e por sequenciamento, a fim de checar a correta inserção dos genes.

A preparação da quantidade necessária de DNA para os experimentos de transformação via biobalística de células de cebola foi feita com QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen).

3.3.2. Transformação transiente de células de epiderme de cebola

Micropartículas de ouro (1 µm) foram utilizadas como carreadoras do DNA através da parede celular das células da epiderme de cebola. O preparo das micropartículas de ouro e a precipitação do DNA na sua superfície foram realizadas como descrito por Sanford et al (1992).

A transformação foi feita via biobalística com equipamento PDS-1000/He™ System (Bio-Rad), com membranas de ruptura de 1100 psi e pressão de vácuo igual a 28 polegadas de Hg (equivalente a 71,12 cm de Hg).

Após a transformação o material foi acondicionado a 28 °C por 24 horas para posterior análise em microscópio de fluorescência (Zeiss, AX10) ou em microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 META).

Para cada construção foram realizadas três experimentos de transformação independentes. Os vetores pEZS-CL e pEZS-NL foram usados como controle.

3.4. Transformação genética de arroz (*O. sativa*) para superexpressão e silenciamento dos genes candidatos

3.4.1. Identificação do peptídeo sinal de secreção

A identificação do peptídeo sinal de secreção foi feita com o programa SignalP (Bendtsen, 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

3.4.2. Construção dos vetores para superexpressão das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*

As sequências codificadoras dos genes de *M. incognita* *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*, sem o peptídeo sinal de secreção, foram amplificadas por PCR com os *primers* listados na Tabela 4.

Tabela 4. *Primers* utilizados para inserção dos efetores *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* em vetor binário pC5300-OE por meio de recombinação através do sistema Gateway[®]

Primer	Sequência(5'-3')
Mi_ <i>MSP2</i> .attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAACCATGGAATGCAGC GGAGATTG
Mi_ <i>MSP2</i> .attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACAATTTAGCATGAATC TTAACTT
Mi_ <i>MSP7</i> .attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAACCATGACAGGCGAT CGAAATGC
Mi_ <i>MSP7</i> .attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAACAGTATTAGCTCTT CCACCAC
Mi_ <i>MSP18</i> .attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAACCATGGTGAATACA GGCATTCC
Mi_ <i>MSP18</i> .attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGTTCATCATATTTTTG CATGGCA

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µl com a enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs®, Inc.) (1 U), Phusion High-Fidelity Buffer (1x), primer sense (500 nM), primer antisense (500 nM) e dNTPs (0,5 mM). A PCR foi programada para uma etapa de desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, 34 ciclos de amplificação (98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 72 °C 60 s) e uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 0,8% e o fragmento correspondente a cada gene foi extraído do gel e purificado com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Os fragmentos purificados foram inseridos em pC5300-OE (Figura 7) por meio de recombinação através do sistema Gateway® com a enzima BP Clonase™ II, de acordo com as recomendações do fabricante, para gerar os vetores pC5300-*MSP2*, pC5300-*MSP7* e pC5300-*MSP18* (Figura 7).

O produto da recombinação foi utilizado para transformação de células termocompetentes de *E. coli* TOP 10. Foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias que cresceram no meio seletivo com o PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), e a análise dos clones transformantes foi realizada por digestão, PCR das colônias e por sequenciamento (Beckman Coulter Genomics, United Kingdom).

Uma vez confirmada a correta inserção dos fragmentos, os vetores pC5300-*MSP2*, pC5300-*MSP7* e pC5300-*MSP18* foram inseridos por eletroporação em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. A transformação das células de *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR de colônias.

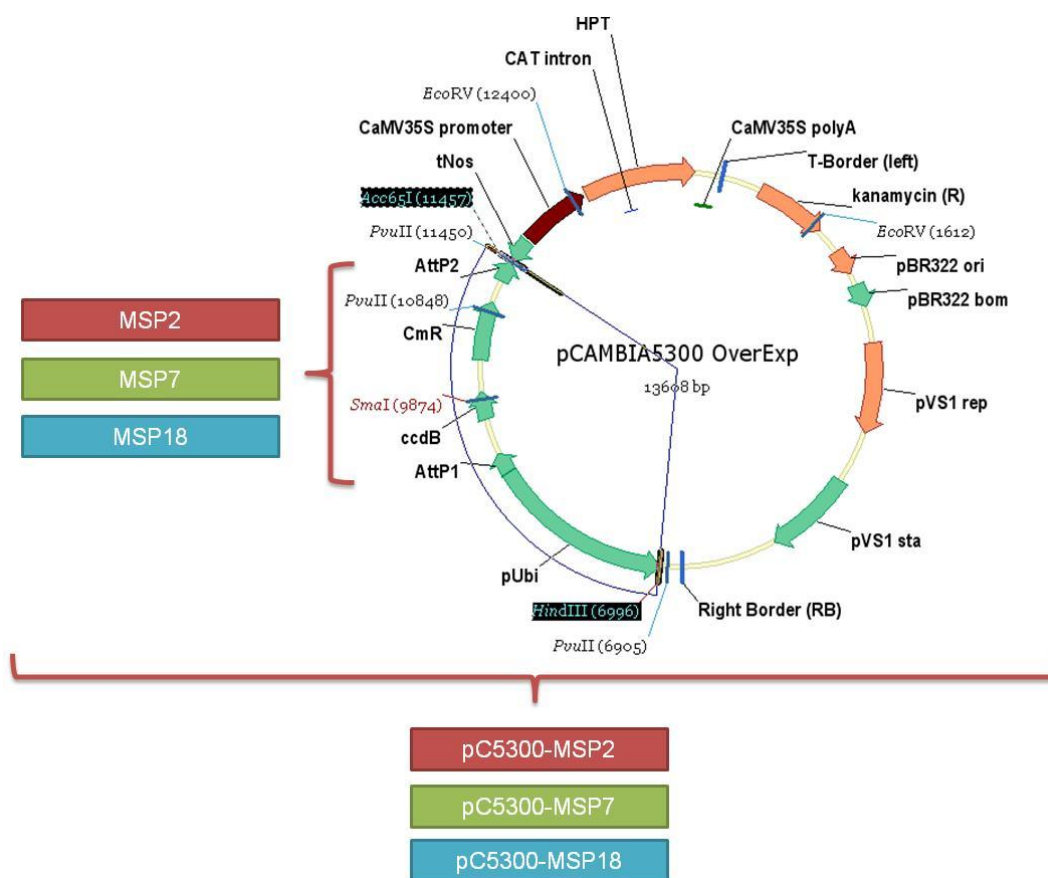


Figura 7. Esquema dos vetores utilizados para obtenção de plantas de arroz transgênicas para superexpressão das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*.

O vetor pCAMBIA-OE foi construído pela inserção do cassete attP1-ccdB-attP2, do sistema Gateway®, no sítio múltiplo de clonagem do pC1300intA.Ubi-tnos (Ouwerkerk *et al.*, 2001, número de acesso NCBI GenBank AF294976), entre o promotor da ubiquitina de milho (Ubi) e o terminador NOS (tNos) (J. C. Breitler, CIRAD, Montpellier, França, dados não publicados). As sequências codificadoras dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* foram inseridos em pC5300-OE por meio de recombinação através do sistema Gateway® entre as bordas AttP1 e AttP2, para obtenção dos vetores pC5300-*MSP2*, pC5300-*MSP7* e pC5300-*MSP18*. O cassete de expressão está sob controle do promotor da ubiquitina do milho (Ubi) e do terminador Nos (tNos).

4.3.3 Construção dos vetores para silenciamento dos genes candidatos

A estratégia de silenciamento *in planta* dos genes candidatos foi baseada na estratégia descrita por Warthmann e colaboradores (2008). A escolha das sequências dos amiRNAs foi feita por meio do programa WMD2 - Web MicroRNA Designer (Ossowski, 2008) (<http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl>), que fornece informações sobre os melhores amiRNAs que podem ser gerados com base na sequência do gene candidato, considerando parâmetros como a

energia de hibridização e coincidência com sequências de outros genes do nematoide ou de outros organismos não alvo. Para cada gene candidato foram gerados dois amiRNAs (Tabela 5).

Tabela 5. Sequências selecionadas para produzir construções de amiRNAs para silenciamento dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*.

Gene	amiRNA	Sequência(5'-3')
<i>MSP2</i>	<i>MSP2</i> -pNW1	TAATTATAGGGGTTGTTACCT
<i>MSP2</i>	<i>MSP2</i> -pNW2	TCAAATTCGCTTCTATCCTC
<i>MSP7</i>	<i>MSP7</i> -pNW3	TCACACTTAATTGACACACTA
<i>MSP7</i>	<i>MSP7</i> -pNW4	TTTTAACGGTACAAGGCTCTT
<i>MSP18</i>	<i>MSP18</i> -pNW5	TCGTAATTTTGAAGTCACCCC
<i>MSP18</i>	<i>MSP18</i> -pNW6	TCCATTCAATTTTTCTGGCGG

Os amiRNAs gerados a partir da análise feita no programa WMD2 foram inseridos em um precursor endógeno de arroz, *osa-MIR528* (Figura 8), por meio de um esquema de PCRs (Figura 9), de acordo com o descrito por Warthmann e colaboradores (2008), com os *primers* listados na Tabela 6.

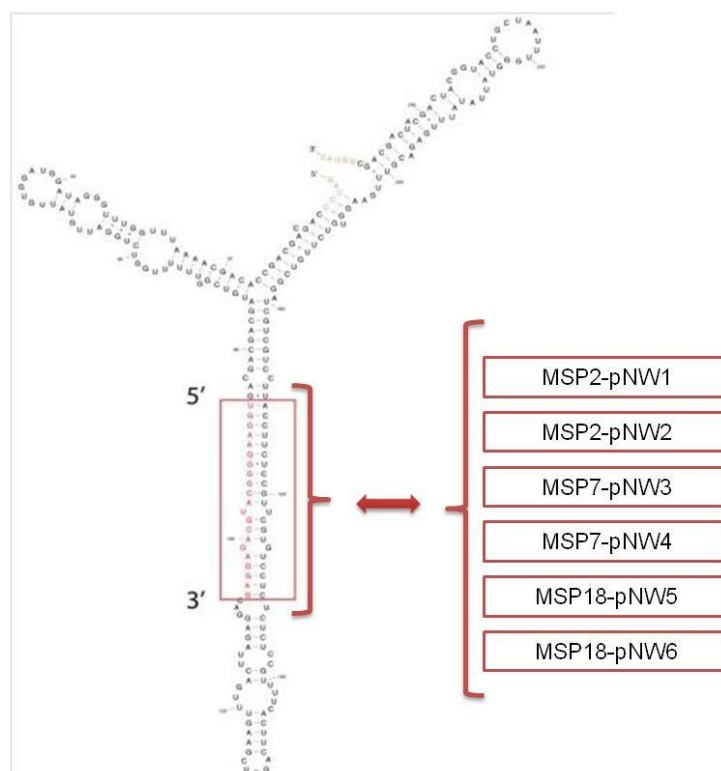


Figura 8. Representação da estrutura secundária *Osa-MIR528*.

O WND2 projeta as sequências dos amiRNAs, bem como os *primers* a serem utilizados, e a substituição é realizada na área destacada pela caixa vermelha.

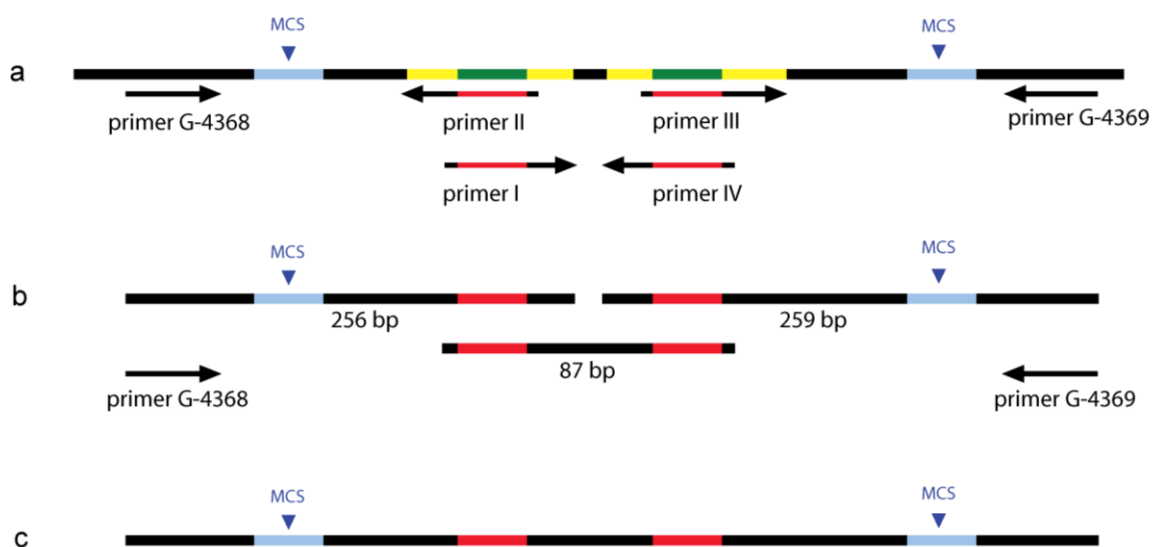


Figura 9. Esquema de PCR para produzir construções de amiRNAs a partir do Osa-MIR528. As sequências de miRNAs originais do Osa-MIR528 (verde) são substituídas pelas sequências de amiRNAs (vermelho) durante as primeiras PCRs (primer G-4368 + primer II, primer G-4369 + primer III e primer I + primer IV) . As sequências no Osa-MIR528 complementares aos *primers* são mostradas em amarelo e o sítio múltiplo de clonagem em azul (a). Estas três reações de PCR geram três fragmentos de DNA (b). Uma PCR com os *primers* G-4368 + G-4369 promove a fusão dos três fragmentos de DNA (b), resultando em um fragmento de DNA para a clonagem (c).

Tabela 6. Primers utilizados para produção de amiRNAs a partir do Osa-MIR528, de acordo com esquema apresentado na Figura 7.

Primer	Sequência(5'-3')
G-4368	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
G-4369	CGCGATAACAATTTACACAGGAAACAG
G-MSP2.1 (primer I)	AGTAATTATAGGGGTTGTTACCTCAGGAGATTCAGTTTGA
G-MSP2.2 (primer II)	TGAGGTAACAACCCCTATAATTACTGCTGCTGCTACAGCC
G-MSP2.3 (primer III)	CTAGGTATCAAGCCCTATAATTATTCCTGCTGCTAGGCTG
G-MSP2.4 (primer IV)	AATAATTATAGGGCTTGATACCTAGAGAGGGCAAAGTGAA
G-MSP2.5 (primer I)	AGTCAAATTCGCTTCTATCCTCCAGGAGATTCAGTTTGA
G-MSP2.6 (primer II)	TGGAGGATAGAAGCGAATTTTGACTGCTGCTGCTACAGCC
G-MSP2.7 (primer III)	CTGAGGAAAGATGCGAATTTTGATTCTGCTGCTAGGCTG
G-MSP2.8 (primer IV)	AATCAAATTCGCATCTTTCCCTCAGAGAGGGCAAAGTGAA
G-MSP7.1 (primer I)	AGTCACACTTAATTGACACACTACAGGAGATTCAGTTTGA
G-MSP7.2 (primer II)	TGTAGTGTGTCAATTAAGTGTGACTGCTGCTGCTACAGCC
G-MSP7.3 (primer III)	CTTAGTGAGTCTATTAAGTGTGATTCTGCTGCTAGGCTG
G-MSP7.4 (primer IV)	AATCACACTTAATAGACTCACTAAGAGAGGGCAAAGTGAA
G-MSP7.5 (primer I)	AGTTTTAACGGTACAAGGCTCTTCAGGAGATTCAGTTTGA
G-MSP7.6 (primer II)	TGAAGAGCCTTGTACCGTTAAAAGTCTGCTGCTACAGCC
G-MSP7.7 (primer III)	CTAAGAGGCTTCTACCGTTAAAATTCCTGCTGCTAGGCTG
G-MSP7.8 (primer IV)	AATTTTAACGGTAGAAGCCTCTTAGAGAGGGCAAAGTGAA
G-MSP18.1 (primer I)	AGTCGTAATTTTGAAGTCACCCCGAGGAGATTCAGTTTGA
G-MSP18.2 (primer II)	TGGGGGTGACTTCAAATACGACTGCTGCTGCTACAGCC
G-MSP18.3 (primer III)	CTGGGGTCACTACAAAATTACGATTCTGCTGCTAGGCTG
G-MSP18.4 (primer IV)	AATCGTAATTTTGTAGTGACCCAGAGAGGGCAAAGTGAA
G-MSP18.5 (primer I)	AGTCCATTCAATTTTCTGGCGGCAGGAGATTCAGTTTGA
G-MSP18.6 (primer II)	TGCCGCCAGAAAATTGAATGGACTGCTGCTGCTACAGCC
G-MSP18.7 (primer III)	CTCCGCCTGAATAATTGAATGGATTCTGCTGCTAGGCTG
G-MSP18.8 (primer IV)	AATCCATTCAATTATTCAGGCGGAGAGAGGGCAAAGTGAA

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 0,8% e o fragmento correspondente a cada gene foi extraído do gel e purificado com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Os fragmentos purificados, após a adição de uma cauda poli-A nas extremidades, foram ligados em pGEM®-T Easy (Promega) usando a T4 DNA Ligase (Promega).

O produto da ligação foi utilizado para transformação de células termocompetentes de *E. coli* TOP 10. Foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias que cresceram no meio seletivo com o PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), e a análise dos clones transformantes foi realizada por sequenciamento (Beckman Coulter Genomics, United Kingdom).

Os amiRNAs inseridos em precursor endógeno de arroz e clonados em pGEM®-T Easy (Promega) foram amplificados por PCR para adição das bordas AttB1 e AttbB (Tabela 7).

Tabela 7. Primers usados para inserção de bordas AttB nas sequências dos amiRNAs para recombinação em vetor binário pC5300-OE.

Primer	Sequência(5'-3')
AttB1- G-11491-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGGATCCCAGCAGCAG CCACAGCAA
AttB2- G-114946-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCGGTACCGCTGCTGAT GCTGATGCCA

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 0,8% e o fragmento correspondente a cada gene foi extraído do gel e purificado com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Os fragmentos purificados foram clonados em pC5300-OE por meio de recombinação através do sistema Gateway® com a enzima BP Clonase™ II, de acordo com as recomendações do fabricante, para gerar os vetores pC5300-MSP2-PNW1, pC5300-MSP2-PNW2, pC5300-MSP7-PNW3, pC5300-MSP7-PNW4, e pC5300-MSP18-PNW5 e pC5300-MSP18-PNW6 (Figura 10).

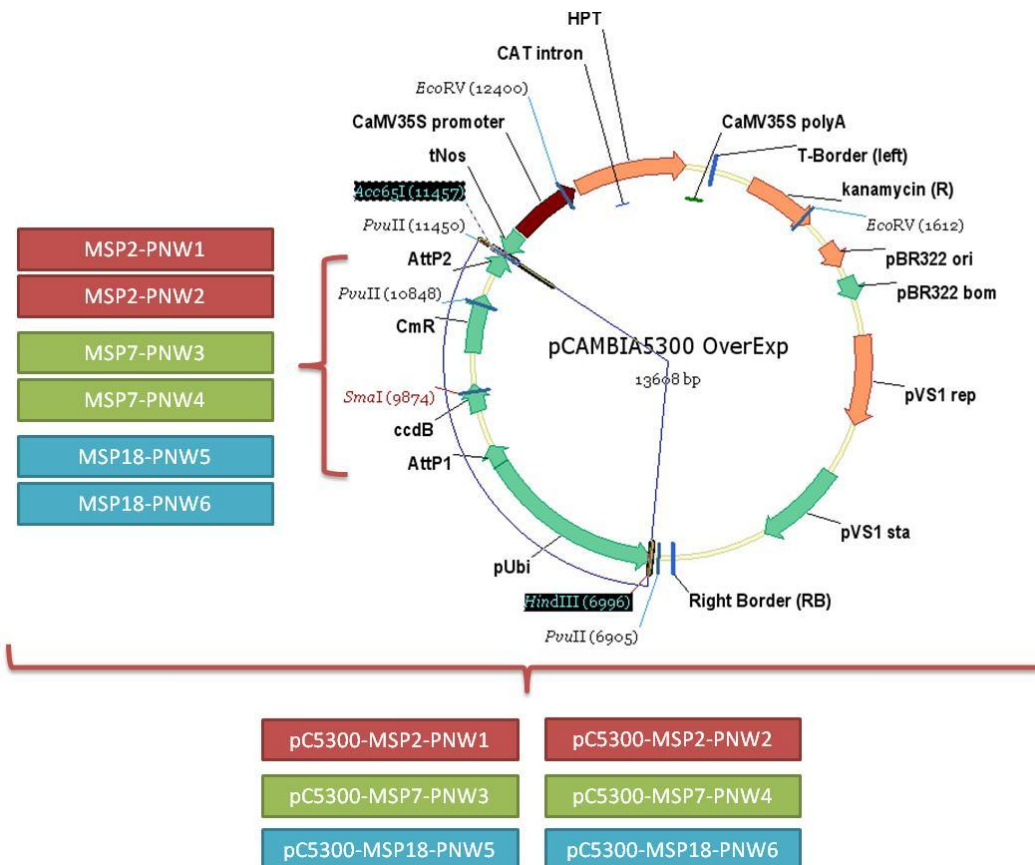


Figura 10. Esquema dos vetores utilizados para obtenção de plantas de arroz transgênicas para silenciamento dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*.

As sequências dos miRNAs selecionadas por meio do programa WMD2 foram inseridas em um precursor endógeno de arroz *osa-MIR528*. O precursor modificado foi inserido em pC5300-OE por meio de recombinação através do sistema Gateway® entre as bordas AttP1 e AttP2, para obtenção dos vetores pC5300-*MSP2*-PNW1, pC5300-*MSP2*-PNW2, pC5300-*MSP7*-PNW3, pC5300-*MSP7*-PNW4, pC5300-*MSP18*-PNW5 e pC5300-*MSP18*-PNW6. O cassete de expressão está sob controle do promotor da ubiquitina do milho (Ubi) e do terminador Nos (tNos).

O produto da recombinação foi utilizado para transformação de células termocompetentes de *E. coli* TOP 10. Foi realizada a extração de DNA plasmidial das colônias que cresceram no meio seletivo com o PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), e a análise dos clones transformantes foi realizada por digestão, PCR das colônias e por sequenciamento (Beckman Coulter Genomics, United Kingdom).

Uma vez confirmada a correta inserção dos fragmentos, os vetores pCAMBIA5300-*MSP2*-PNW1, pCAMBIA5300-*MSP2*-PNW2, pCAMBIA5300-*MSP7*-PNW3, pCAMBIA5300-*MSP7*-PNW4, e pCAMBIA5300-*MSP18*-PNW5 e pCAMBIA5300-*MSP18*-PNW6 foram inseridos por eletroporação em células

eletrocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105. A transformação das células de *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR de colônias.

3.4.3. Transformação genética de arroz

A transformação genética de plantas de arroz foi realizada na plataforma REFUGE. A transformação de arroz foi realizada de acordo com o descrito por Sallaud e colaboradores (2003). A variedade de arroz utilizada para obtenção das plantas transgênicas foi a Nipponbare, pertencente à subespécie japônica de *O. sativa* e suscetível a *M. incognita*.

3.4.4. Caracterização molecular das plantas transgênicas de arroz

A caracterização molecular das plantas transgênicas de arroz também foi realizada na plataforma REFUGE, e para esta finalidade foram utilizadas duas metodologias: Southern Blot e qPCR.

3.4.4.1. Southern Blot

Para a análise de Southern Blot foi realizada a extração de DNA a partir de 200 mg de folhas liofilizadas de plantas T0, utilizando 800 µl do tampão de extração MATAB (alkyl trimethyl ammonium bromide) [100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1,5 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% (m/v) MATAB, 1% (m/v) PEG 6000, 0,5% (m/v) Na₂SO₂] pré-aquecido a 72 °C. A mistura foi incubada por 45 min a 72 °C, o DNA foi extraído com clorofórmio e precipitado com etanol. Dez µg de DNA genômico foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*I. O DNA foi precipitado com NaCl 5 M e etanol e ressuspenso em água. O produto da digestão foi migrado em gel de agarose 0,8% para separar os fragmentos de acordo com o seu tamanho. Após a migração o gel foi tratado com agente desnaturante, HCl 0,25 N por 10-15 min e depois NaOH 0,4 N por 30 min, para a obtenção de fragmentos de DNA de fita simples e possibilitar a hibridação da sonda. O DNA fita simples do gel foi

transferido para uma membrana de náilon por capilaridade em um sistema composto por esponja e camadas de papel toalha sobrepostos por um peso, para a criação de uma corrente ascendente de fluido a fim de permitir o movimento do DNA do gel para a membrana.

Após um passo de pré-hibridação, em que a membrana que contém o DNA foi colocada sob as condições de pH, temperatura e salinidade necessárias para a hibridação, a hibridação foi realizada por meio do contato do DNA genômico fita simples da membrana com a sonda molecular com as extremidades 5' marcadas radioativamente com radioisótopos fósforo alfa ^{32}P . A sonda utilizada corresponde a um fragmento do gene de resistência a higromicina, constituinte do T-DNA no pC5300-OE. Após um passo de lavagem para eliminar as moléculas não hibridizadas, a membrana foi submetida a auto-radiografia que compreende a impregnação de uma película fotográfica por radiação dos produtos marcados e, assim, permitir a visualização dos fragmentos de interesse.

3.4.4.2. qPCR

As reações de qPCR para determinação do número de cópias das plantas T0 foram realizadas num termociclador LightCycler[®] 480 System (Roche, Basel, Switzerland). A estimativa do número de cópias foi realizada a partir da amplificação do gene de resistência a higromicina, presente no T-DNA dos vetores utilizados para a transformação das plantas. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 8.

Tabela 8. *Primers* utilizados nas reações de qPCR para determinar do número de cópias das plantas T0.

Primer	Sequência (5'-3')
qHPT-F	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGA
qHPT_R	GGACCGATGGCTGTGTAGAAG
qActin-F	CTCAACCCCAAGGCTAACAG
qActin-R	ACCTCAGGGCATCGGAAC

As reações de qPCR foram realizadas em volume final de 15 μl com Quantitect Sybergreen[®] (Qiagen, Germantown, MD, EUA) 1x, 10 μM de cada primer (sense e antisense) e 3 μl DNA genômico (concentração aproximada de

1,2 ng μl^{-1}). As condições de amplificação foram 95 ° C por 5 min, seguido por 45 ciclos de 95 ° C 15s, 60 ° C 20s, 72 ° C 40s e um ciclo final de 72 ° C por 10 min.

Foi gerada a curva de dissociação dos produtos da PCR a fim de testar a especificidade dos *primers* utilizados. As reações de qPCR foram realizados em quadruplicata com a inclusão de um controle com adição de água no lugar do cDNA e de um controle com DNA genômico de Nipponbare não transformado. A expressão dos genes de interesse foi normalizada com a expressão do gene actina de *O. sativa*. Os resultados normalizados foram submetidos a análise comparativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Nesta análise comparativa a expressão do gene higromicina de cada amostra foi relativizada com a expressão deste mesmo gene na amostra de uma planta com uma cópia do gene inserido no genoma (previamente determinada por análise de Southern Blot), chamada de amostra de referência. A estimativa do número de cópias se deu conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Estimativa do número de cópias nas plantas transgênicas de arroz T0 por qPCR.

Razão amostra/referência	Estimativa de número de cópias
0,3 a 1,2	1
1,3 a 2	2
>2	>2

4. Resultados

4.1. Análise dos genes e proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18*

Os genes *MSP2* (acesso NCBI GenBank - AF531161.1), *MSP7* (acesso NCBI GenBank - AF531166.1 e *Meloidogyne incognita* resources - Minc14900) e *MSP18* (acesso NCBI GenBank - AY134437.1 e *Meloidogyne incognita* resources - Minc06492) codificam para proteínas de 210, 176 e 172 aminoácidos, respectivamente. A proteína *MSP2* apresenta peso molecular de cerca de 22kDa e as proteínas *MSP7* e *MSP18* apresentam peso molecular de cerca de 17 kDa

Os três genes são expressos nas glândulas esofágicas de *M. incognita*. A expressão de *MSP2* (2G02) foi observada apenas nas glândulas subventrais de J2 parasita, enquanto que a expressão de *MSP7* (7E12) e *MSP18* (17H2) foi observada na glândula dorsal do J2 parasita, J3 e fêmeas adultas (Huang *et al.*, 2003) (Tabela 10).

Quando foram publicadas, as sequências dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* não retornaram homologia com qualquer sequência gênica publicada em bancos de dados públicos. Novas análises com as sequências dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* não retornaram nenhuma homologia quando comparadas contra o banco de dados de nucleotídeos do NCBI - The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências das proteínas codificadas por estes genes foram submetidas a um BLASTp contra o banco de dados de sequências proteicas não redundantes do NCBI, retornando apenas as homologias já descritas por Huang e colaboradores (2003) (Tabela 10).

Tabela 10. Dados das proteínas efetoras isoladas no trabalho de Huang e colaboradores (2003).

Clone	Accession no. ^b	FL/ORF (bp) ^c	Highest homology	Blastp score/E value	Gland expression ^d		
					Pre-J2	Par-J2	J3-A
2E07	AF531160	694/522	Pioneer ^d		...	DG	DG
2G02	AF531161	776/630	Pioneer		...	SvG	...
2G10	AY135363	999/384	Pioneer		...	DG	DG
4D01	AF531162	785/522	Hypothetical protein— <i>Caenorhabditis elegans</i>	517/e ⁻⁰⁶	...	SvG	...
4D03	AY135364	864/573	Hypothetical protein— <i>C. elegans</i>	132/2e ⁻³⁰	...	DG	DG
5G05	AY135362	977/813	Hypothetical protein— <i>C. elegans</i>	165/5e ⁻⁴⁰	...	SvG	...
6F06	AF531163	1339/990	Hypothetical protein— <i>Methanosarcina mazei</i>	54/2e ⁻⁰⁶	...	DG	DG
6G07	AF531164	762/291	Pioneer		...	DG	DG
7A01	AF531165	778/540	Pioneer		...	DG	DG
7E12	AF531166	757/528	Pioneer		...	DG	DG
7H08	AF531168	1091/900	Pioneer		...	DG	DG
8D05	AF531169	1282/990	Pioneer		SvG	SvG	SvG
8H11	AF531170	1228/954	Hypothetical protein— <i>C. elegans</i>	62/1e ⁻⁰⁸	SvG	SvG	SvG
9H10	AF531167	737/534	Pioneer		...	DG	DG
10A08	AY142117	656/498	Sodium/calcium/potassium exchanger— <i>Tursiops truncatus</i> (99% identity to 5' end of 8H11)	58/4e ⁻⁰⁸	SvG	SvG	SvG
10G02	AY135365	1499/1242	Hypothetical protein— <i>Leishmania major</i>	54/5e ⁻⁰⁶	...	DG	DG
11A01	AY134431	1266/447	Pioneer (89% identity to 2E07) ^f		...	DG	DG
12H03	AY134432	723/552	Pioneer (97% identity to 7A01)		...	DG	DG
13A12	AY134433	824/522	Pioneer (90% identity to 2E07)		...	DG	DG
14E06	AY134434	696/525	Pioneer (98% identity to 7E12)		...	DG	DG
16D10	AY134435	364/129	Pioneer		...	SvG	SvG
16E05	AY134436	1687/1311	Pioneer		...	DG	...
17H02	AY134437	783/516	Pioneer		...	DG	DG
19F07	AY142116	798/645	Pioneer		...	DG	DG
21E02	AY134438	704/528	Pioneer (95% identity to 7E12)		...	DG	DG
25B10	AY142118	414*/333	Pioneer		...	DG	...
28B04	AY142119	748/519	Pioneer (95% identity to 7E12)		...	DG	DG
30G11	AY134440	1511/1374	Acid phosphatase— <i>C. elegans</i>	214/2e ⁻⁵⁴	SvG	SvG	...
30H07	AY134439	994/783	Pioneer		SvG	SvG	...
31H06	AY134441	362/150	Pioneer		SvG	SvG	...
34C04	AF527788	1124/813	Pectate lyase— <i>M. javanica</i>	477/1e ⁻¹³⁴	SvG	SvG	...
34D01	AY134442	782/540	Pioneer (89% identity to 7A01)		...	DG	DG
34F06	AY134443	801/357	Pioneer		...	DG	DG
35A02	AY134444	2210/1848	Pioneer		SvG	SvG	SvG
35E04	AY142121	836/441	Pioneer (99% identity to 5' end of 19F07)		...	DG	DG
35F03	AY142120	398/141	Pioneer		...	DG	...
42G06	AF049139	860/609	Cellulose binding protein— <i>M. incognita</i>	352/1e ⁻⁹⁶	SvG

Gland expression = glândula de expressão. ^a Hibridização *in situ* com sondas de cDNA de transcritos expressos especificamente nas glândulas subventrais (SvG) e na glândula dorsal (DG) de J2 pré-parasitas (Pre-J2), J2 parasitas (Par-J2) ou estádios mais avançados (J3-A) de *M. incognita*. ... = Não detectado.

Clone = nome do clone.

Accession no. = número de acesso. ^b Número de acesso das novas sequências submetidas ao GenBank, com exceção de AF049139, que já estava disponível no banco de dados.

FL/ORF (bp) = full-length/open reading frame (sequência completa/fase aberta de leitura) ^c Tamanho da sequência completa de cada gene e da ORF (códon de iniciação até códon de terminação) predita. * indica sequências incompletas.

Highest homology = maior homologia. ^d Novos transcritos sem homologia com qualquer gene publicado em bancos de dados públicos. ^e Porcentagem de identidade entre resíduos de aminoácidos das proteínas preditas.

A análise das sequências das proteínas MSP2, MSP7 e MSP18 mostraram que todas possuem um peptídeo sinal de secreção na extremidade N-terminal. Os possíveis sítios de clivagem destes peptídeos, previstos com o programa SignalP (Bendtsen, 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), se encontram entre os aminoácidos 18 e 19 em MSP2, 23 e 24 em MSP7 e 20 e 21 em MSP18 (Figura 11).

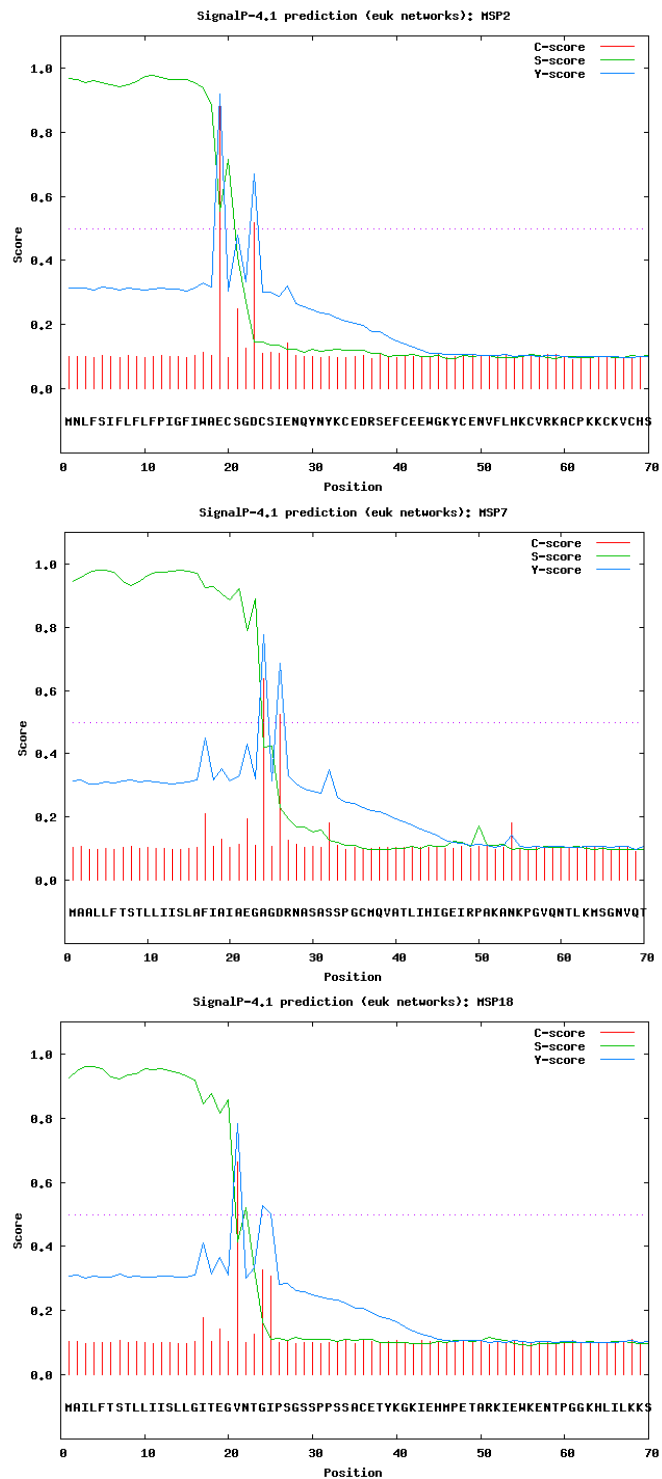


Figura 11. Resultados da análise realizada no programa SignalP para predição da presença de peptídeo sinal e da sua posição de clivagem nas proteínas MSP2, MSP7 e MSP18.

S-score (linha verde) distingue resíduos de aminoácidos usualmente encontrados em peptídeos sinais, normalmente hidrofóbicos, e prediz a existência do peptídeo sinal na sequência analisada. C-score (linhas vermelhas) é elevado na posição imediatamente posterior ao sítio de clivagem. Y-score (linha azul) é uma média entre o C-score e o S-score, que permite uma predição mais precisa do sítio de clivagem, visto que podem haver vários picos de C-score, sendo apenas um o verdadeiro sítio de clivagem. O Y-score distingue entre os picos de C-score aquele em que a inclinação é maior.

Análises adicionais das sequências das proteínas MSP2, MSP7 e MSP18, sem o peptídeo sinal de secreção, foram realizadas com o programa PSORTII Prediction (Nakai e Horton, 1999), que fornece uma predição da localização subcelular de proteínas em Eucariotos. Os resultados mostraram que as três proteínas possuem sinal de localização nuclear.

4.2. Cinética de expressão dos genes candidatos durante a interação arroz-nematoide

A expressão dos genes de *M. incognita* MSP2, MSP7 e MSP18 foi quantificada por meio de qRT-PCR de galhas e pontas de raízes de arroz coletadas aos 6, 10 e 20 d.a.i. pelo patógeno.

A curva de dissociação dos produtos gerados na qRT-PCR mostra a especificidade dos *primers* utilizados (Figura 11).

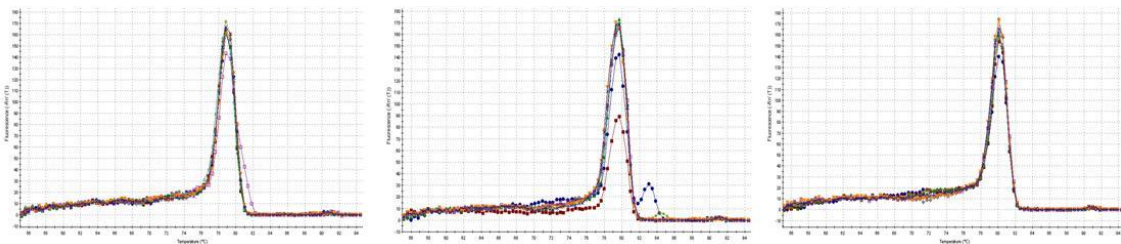


Figura 12. Curva de dissociação do produto da amplificação dos genes de *M. incognita* MSP2, MSP7 e MSP18.

Curva de dissociação realizada com uma taxa de transição de temperatura linear de $0,1\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ com determinação contínua da aquisição da fluorescência.

O pico de expressão do gene *MSP2* ocorre nos estádios iniciais da infecção. Aos 6 d.a.i. o gene *MSP2* é expresso cerca de 128 vezes mais do que em J2, mantendo uma expressão elevada aos 10 d.a.i., cerca de 32 vezes maior que no J2, e reduzindo a sua expressão praticamente ao mesmo nível a que é encontrada em J2 pré-parasita aos 20 d.a.i. (Figura 12).

Os genes *MSP7* e *MSP18* por sua vez são altamente expressos na fase inicial do ciclo de parasitismo, mantendo a expressão praticamente constante até as fases mais avançadas (Figura 12).

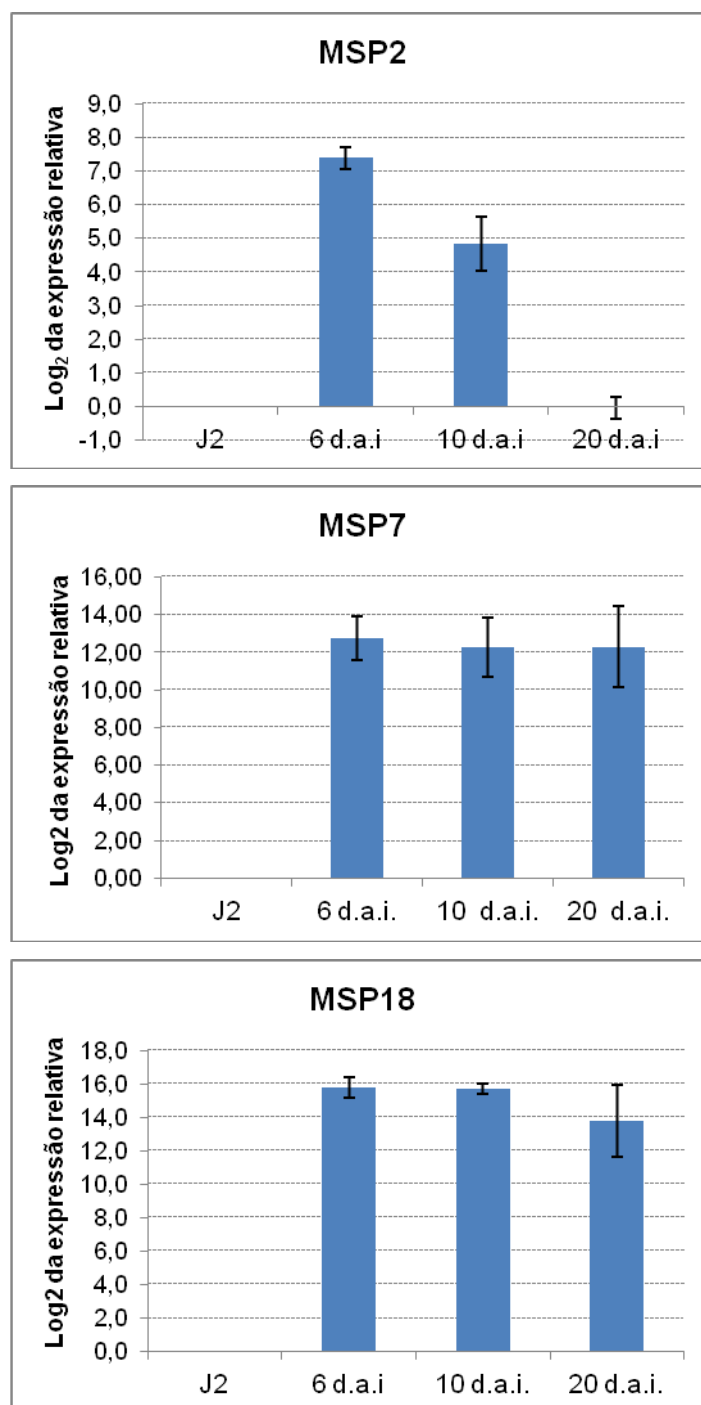


Figura 13. Cinética de expressão dos genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* durante a interação arroz-nematoide.

A expressão dos genes de *M. incognita* *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* foi quantificada por meio de qRT-PCR de galhas e pontas de raízes de arroz coletadas aos 6, 10 e 20 d.a.i. pelo patógeno. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para calcular a variação na expressão dos genes, sendo que a expressão foi normalizada com o gene de referência β -actina de *M. incognita* e relativizada com a J2 pré-parasita. As barras representam o erro padrão da média das três replicatas biológicas. J2=juvenil pré-parasita de segundo estágio; d.a.i.=após a infecção com J2.

4.3. Localização subcelular dos efetores em células vegetais

A localização subcelular dos efetores *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* em células vegetais foi analisada por meio da transformação transiente, via biobalística, de células da epiderme de cebola com os vetores pEZX-NL-*MSP2*, pEZX-NL-*MSP7* e pEZX-NL-*MSP18*.

Foi também realizada a transformação de células da epiderme de cebola com os vetores pEZX-CL-*MSP2* e pEZX-CL-*MSP7*, porém em nenhuma das três repetições foram obtidas células transformadas com estes vetores. Para o vetor pEZX-CL-*MSP18* não foi obtido sucesso nos experimentos de clonagem. Transformações anteriores, realizadas no mesmo laboratório e com a mesma técnica mostraram não haver diferença na localização subcelular de outros efetores de *M. incognita* em fusões N- ou C-terminal com GFP (Manelli, 2012; Nguyen, dados não publicados).

Como esperado, a fluorescência emitida pela GFP pode ser observada em toda a célula da epiderme de cebola quando esta foi transformada com os vetores pEZX-CL e pEZX-NL, expressando a GFP livre (Figura 14).

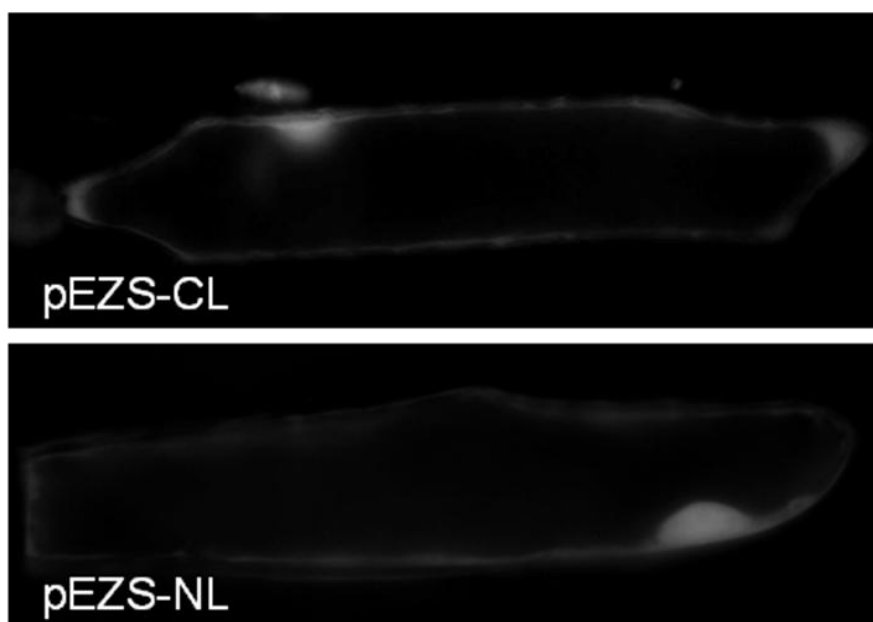


Figura 14. Sinal de fluorescência emitida pela GFP em células da epiderme de cebola transformadas com os vetores pEZX-CL e pEZX-NL (GFP livre).

Transformação transiente via biobalística de células da epiderme de cebola com os vetores pEZX-CL e pEZX-NL para mostrar o padrão de fluorescência emitida pela GFP livre. Imagens realizadas em microscópio de fluorescência AX10, Zeiss. Fonte: Imagens cordialmente cedidas por Phong Nguyen.

O produto da fusão *MSP2-EGFP* mostrou forte sinal de fluorescência no núcleo da célula vegetal, sem traços em outros compartimentos subcelulares (Figura 15). A coloração realizada com DAPI indica que os pontos sem fluorescência, observados no núcleo das células, correspondem aos nucléolos. Os nucléolos não apresentam sinal de fluorescência quando corados com DAPI, pois este se liga exclusivamente ao DNA e os nucléolos não possuem DNA na sua composição.

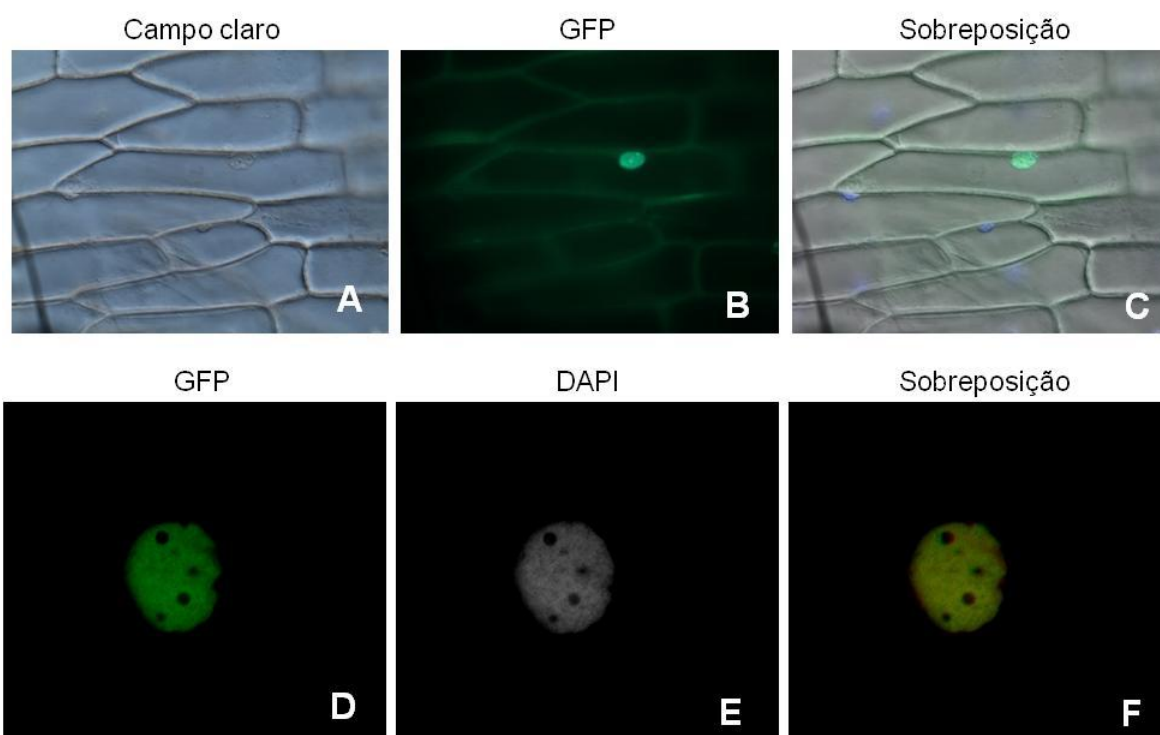


Figura 15. Localização subcelular do efector de *M. incognita* *MSP2*.

Sinal de fluorescência localizado no núcleo de células da epiderme de cebola transformadas via biobalística com o vetor pEZS-NL-*MSP2*. Os pontos sem fluorescência observados nas imagens D, E e F correspondem aos nucléolos da célula. Imagens realizadas em microscópio de fluorescência AX10, Zeiss, (A-C) e com microscópio confocal LSM 510 META, Zeiss (D-F).

Os produtos das fusões *MSP7-EGFP* e *MSP18-EGFP* mostraram sinal de fluorescência no citoplasma, imediatamente abaixo da parede celular, e no núcleo da célula vegetal (Figura 16), de forma similar a localização subcelular de GFP livre (controle) (Figura 14). O sinal de fluorescência observado no núcleo das células vegetais transformadas com o produto das fusões *MSP7-EGFP* e *MSP18-EGFP* se deve ao fato de que proteínas pequenas (< de 40-45 kDa) se difundem passivamente através dos poros da membrana nuclear.

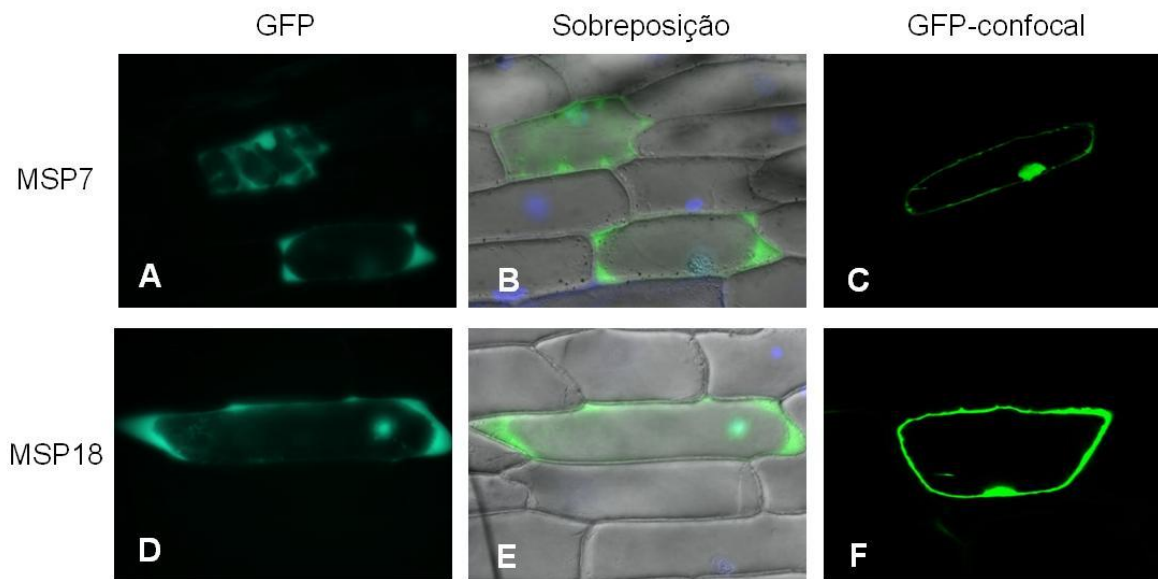


Figura 16. Localização subcelular dos efetores de *M. incognita* MSP7 e MSP18.

Sinal de fluorescência localizado no citoplasma e no núcleo das células de células da epiderme de cebola transformadas via biobalística com os vetores pEVS-NL-MSP7 (A-C) e pEVS-NL-MSP18 (D-F). A sobreposição é composta por imagens do campo claro:GFP:DAPI. Imagens realizadas em microscópio de fluorescência AX10, Zeiss, (A e B, D e E) ou em microscópio confocal LSM 510 META, Zeiss (C e F).

A reprodutibilidade da técnica e dos resultados obtidos pode ser observada na figura 17, onde podem ser observadas grupos de células transformadas com as construções pEVS-NL-MSP2, pEVS-NL-MSP7 e pEVS-NL-MSP18, cada uma mostrando o mesmo padrão de distribuição de fluorescência.

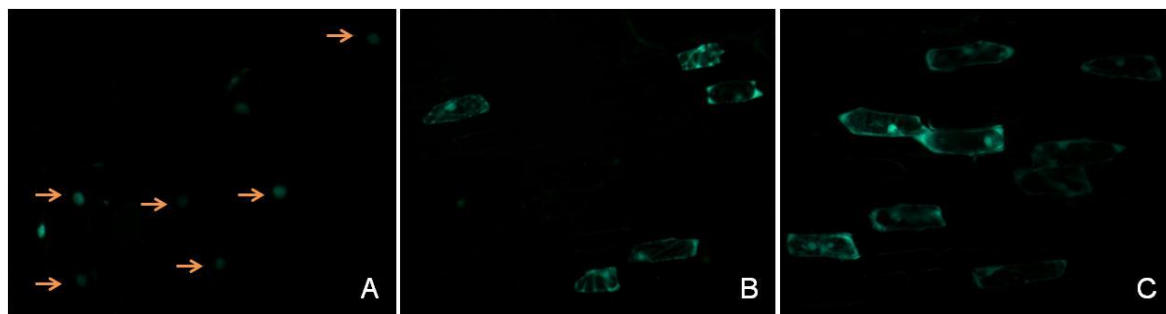


Figura 17. Reprodutibilidade dos resultados da transformação de células da epiderme de cebola com as construções pEVS-NL-MSP2, pEVS-NL-MSP7 e pEVS-NL-MSP18.

As imagens acima mostram a reprodutibilidade da técnica de transformação de células de epiderme de cebola e a uniformidade dos resultados obtidos com as construções pEVS-NL-MSP2 (A), pEVS-NL-MSP7 (B) e pEVS-NL-MSP18 (C). As setas indicam os núcleos das células. Imagens realizadas em microscópio de fluorescência AX10, Zeiss

4.4. Transformação genética de arroz

A transformação genética de arroz para superexpressão das proteínas MSP2, MSP7 e MSP18 foi realizada com os vetores pC5300-MSP2, pC5300-MSP7 e pC5300-MSP18 (Figura 7). Para obtenção de plantas de arroz transgênicas para expressando de amiRNAs para silenciamento dos genes MSP2, MSP7 e MSP18 foram utilizados os vetores pC5300-MSP2-PNW1, pC5300-MSP2-PNW2, pC5300-MSP7-PNW3, pC5300-MSP7- PNW4, pC5300-MSP18- PNW5 e pC5300-MSP18-PNW6 (Figura 10).

A transformação genética de arroz foi realizada na plataforma Refuge, de acordo com protocolo descrito por Sallaud e colaboradores (2003) e apresentado resumidamente na Figura 18.

Devido ao grande número de construções, a transformação genética de arroz foi realizada em três períodos diferentes (Tabela 11).

Tabela 11. Construções utilizadas para a transformação genética de arroz, código de cada construção, data da transformação e número de plantas aclimatadas em casa de vegetação.

Construção	Código da construção	Data da transformação	Nº de plantas
pC5300-MSP2	MB1	08/07/2011	24
pC5300-MSP7	MB2	08/07/2011	24
pC5300M-MSP18	MB3	08/07/2011	24
pC5300 (Controle)	MB4	08/07/2011	24
pCAMBIA5300-MSP2-PNW1	MB5	29/08/2011	24
pCAMBIA5300-MSP2-PNW2	MB6	29/08/2011	24
pCAMBIA5300-MSP7-PNW3	MB7	24/04/2012	24
pCAMBIA5300-MSP7-PNW4	MB8	29/08/2011	24
pCAMBIA5300-MSP18-PNW5	MB9	24/04/2012	24
pCAMBIA5300-MSP18-PNW6	MB10	29/08/2011	24

Para as plantas analisadas por qPCR a coleta de material vegetal para análise foi realizada no momento da aclimação. A coleta de material vegetal para análises de Southern Blot foi realizada depois da aclimação das plantas em casa de vegetação

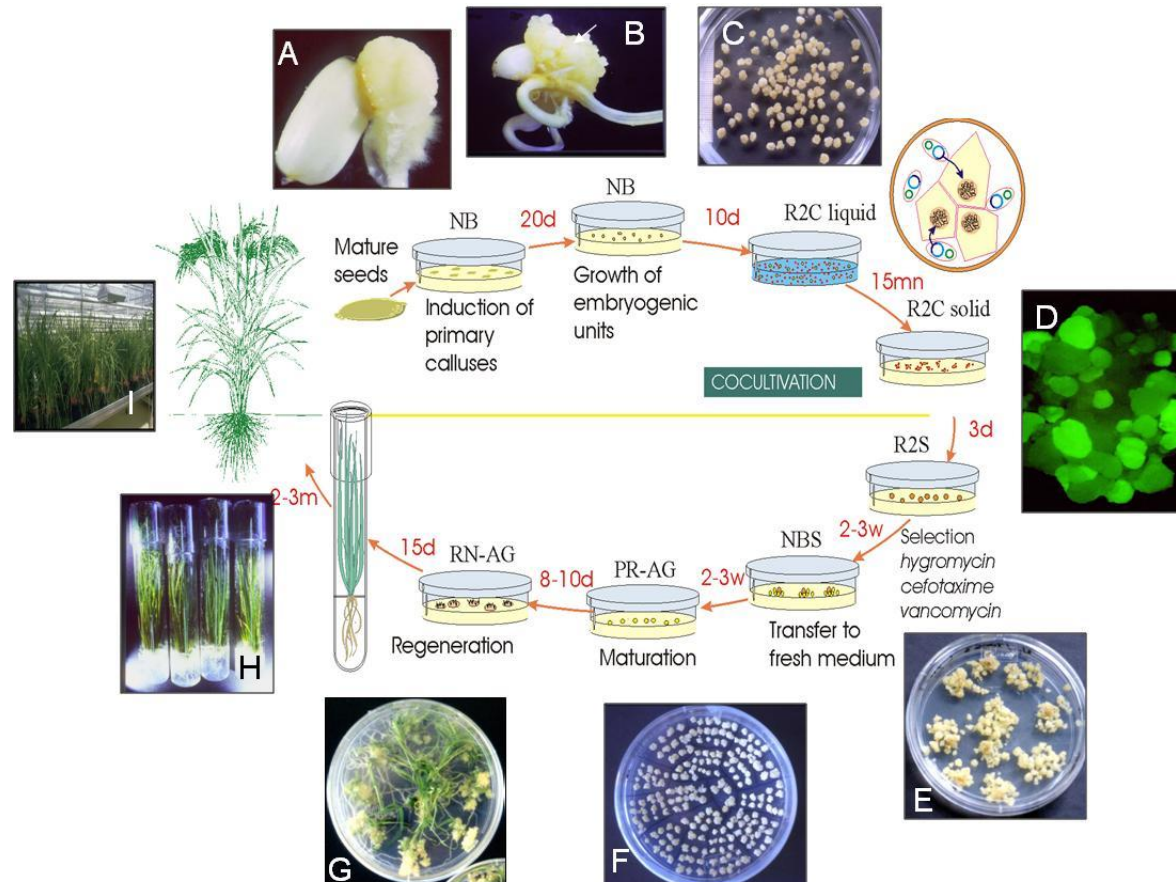


Figura 18. Transformação genética de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Sementes de arroz foram utilizadas para indução de calos em meio de indução contendo 2,4-D (A e B). Após a indução os calos foram transferidos para meio de crescimento (C) e depois de 10 dias foram transformados por meio de co-cultivo com a *Agrobacterium tumefaciens*. Os calos transformados foram mantidos em meio de cultivo por 3 dias (D) e transferidos para meio seletivo onde permanecem por cerca de 2-3 semanas (E). Depois deste período eles foram transferidos para meio de cultivo, por 2-3 semanas, (F), para meio de maturação, de 8-10 dias, e meio de regeneração (G), 15 dias. Do meio de regeneração foram transferidas plântulas para tubos de ensaio (H). Depois de bem estabelecidas as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação e mantidas até a produção de sementes (I). Fonte: Imagem gentilmente cedida pela equipe da plataforma Refuge.

4.5. Caracterização molecular das plantas transgênicas

A análise de Southern Blot é a metodologia clássica utilizada para a determinação do número de cópias inseridas no genoma de plantas transgênicas. Este tipo de análise apresenta custo elevado e é bastante laboriosa, o que limita a sua aplicação em larga escala.

A qPCR, por sua vez, tem várias vantagens quando comparada ao Southern Blot, destacando-se a maior segurança, por não envolver manipulação de radioatividade; a rapidez, permitindo obter os resultados em um dia; a facilidade de análise dos dados e a menor quantidade de material vegetal requerido para extração de DNA, que permite a genotipagem no momento de aclimação das plantas e reduz o número de plantas a serem mantidas em casa de vegetação.

Com base nisso, a equipe de genotipagem da plataforma REFUGE trabalhou na calibração da estimativa do número de cópias das plantas transgênicas de arroz por meio da análise de qPCR. Esta calibração foi realizada por meio da comparação de resultados das análises de Southern Blot e qPCR.

As plantas transgênicas T0 transformadas com as construções MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6, MB8 e MB10 foram analisadas por Southern Blot para determinação do número de cópias do transgene inserido no genoma. As membranas são apresentadas na Figura 19 e o resumo dos resultados referentes a cada construção se encontra na Tabela 12.

Tabela 12. Análise de Southern Blot do número de cópias do transgene inserido no genoma de plantas de arroz transformadas com as construções MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6, MB8 e MB10.

Construção	1 cópia		2 cópias		3 ou + cópias		Ilegível		Total	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%

MB1	8	44	3	17	4	22	3	17	18	100
MB2	6	33	5	28	7	39	0	0	18	100
MB3	7	47	2	13	6	40	0	0	15	100
MB4	3	60	1	20	0	0	1	20	5	100
MB5	8	33	6	25	9	38	1	4	24	100
MB6	2	9	11	48	9	39	1	4	23	100
MB8	7	35	8	40	4	20	1	5	20	100
MB10	3	15	6	30	10	50	1	5	20	100

A análise do número de cópias das plantas transformadas com as construções MB7 e MB9 foi realizada por qPCR, visto que no momento da análise destas plantas a calibração da estimativa por meio desta técnica já havia sido realizada pela equipe da plataforma Refuge. O resumo da análise é apresentado na Tabela 13.

Tabela 13. Análise de qPCR do número de cópias do transgene inserido no genoma de plantas de arroz transformadas com as construções MB7 e MB9.

Construção	1 ou 2 cópias	3 ou + cópias	Ilegível	Total
MB7	18	6	0	24
MB9	16	6	2	24

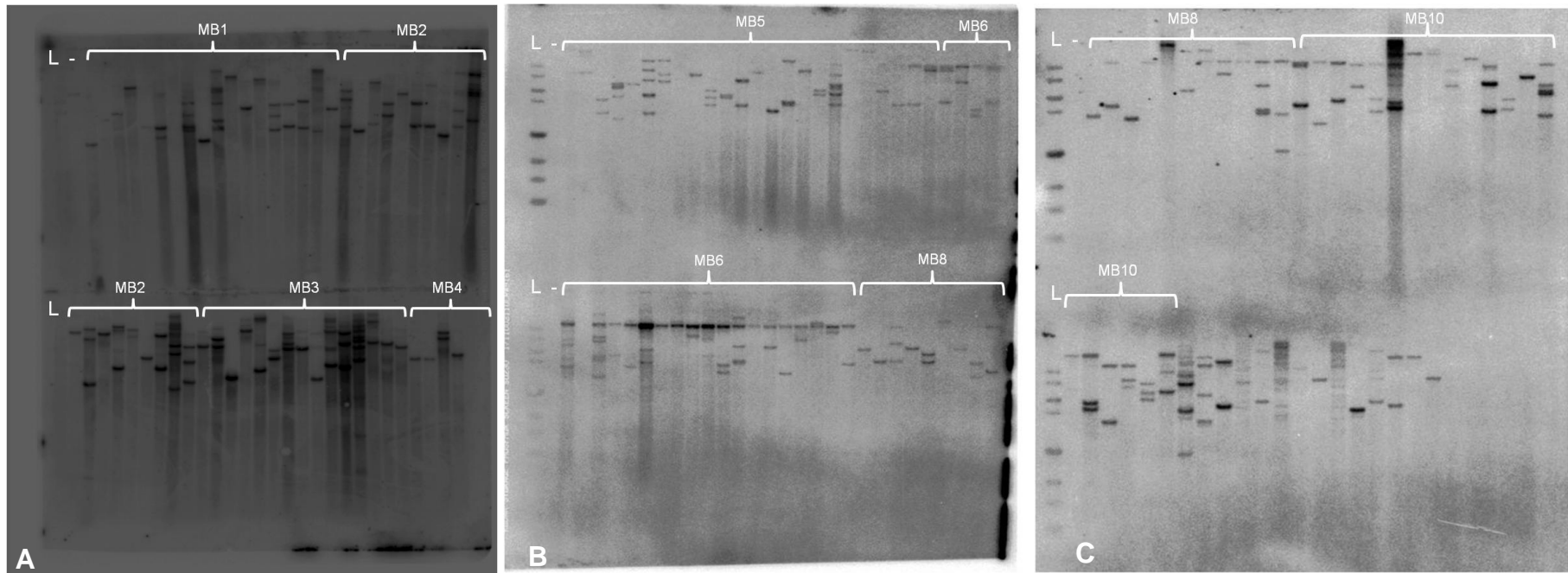


Figura 19. Membranas de Southern Blot das plantas transgênicas de arroz transformadas com as construções MB1, MB2, MB3, MB4, MB5, MB6 MB8 e MB10.

Foram analisadas por Southern Blot, para determinação do número de cópias do transgene inserido no genoma, plantas transformadas com as construções MB1 (18 plantas), MB2 (18 plantas), MB3 (15 plantas), MB4 (5 plantas) (A), MB5 (24 plantas), MB6 (23 plantas) (B), MB8 (20 plantas) (B e C) e MB10 (20 plantas) (C). L= 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); '-'=controle negativo (DNA extraído de planta de arroz não transformada).

4.6. Seleção das linhagens e obtenção da geração T2

A seleção das plantas T0, para obtenção das linhagens T1 e posteriormente das linhagens T2, foi realizada com base nos resultados da caracterização molecular e do número de sementes obtidas destas plantas.

Para cada construção foram selecionadas três linhagens, cada qual com uma ou duas cópias do transgene inserido no genoma de acordo com os resultados obtidos nas análises de Southern Blot e qPCR. Outro critério utilizado foi selecionar plantas T0 que tivessem produzido 20 ou mais sementes T1, uma vez que muitas plantas T0 produziram um número muito baixo de sementes T1.

Um total de 20 sementes T1, de cada linhagem selecionada, foram semeadas em bandejas contendo substrato. Depois de 15 dias, dez plantas de cada linhagem foram selecionadas ao acaso, transplantadas em vasos e transferidas para casa de vegetação onde foram cultivadas até a coleta das sementes T2.

5. Discussão

Proteínas efetoras produzidas nas glândulas esofágicas e secretadas nas células do hospedeiro através do estilete têm papel fundamental na infecção e parasitismo das plantas por fitonematoides (Rosso *et al.*, 2012; Hewezi e Baum, 2012). Apesar do considerável progresso que tem sido feito na identificação das proteínas secretadas por fitonematoides, acessar a função biológica destas proteínas continua sendo um grande desafio.

Este trabalho é o início de uma análise detalhada sobre o papel que três proteínas efetoras de *M. incognita*, MSP2, MSP7 e MSP18, desempenham no parasitismo de fitonematoides. Os resultados aqui obtidos mostram que os genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* possuem padrões de expressão elevados durante a interação com a planta hospedeira e que as três proteínas podem se localizar em diferentes compartimentos subcelulares (núcleo ou citoplasma) das células vegetais. Foram obtidas plantas de arroz transgênicas que expressam as proteínas MSP2, MSP7 e MSP18, ou amiRNA para o silenciamento destes genes e linhagens T2, derivadas de plantas T0 com uma ou duas cópias do transgene inserido no genoma. O desafio das plantas transgênicas com o nematoide permitirá determinar o papel dessas proteínas na virulência de *M. incognita*.

Os genes *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* codificam para proteínas de 210, 176 e 172 aminoácidos, respectivamente, são expressos exclusivamente em glândulas esofágicas de *M. incognita* e apresentam um peptídeo sinal de secreção na extremidade N-terminal. Análises de BLAST das sequências nucleotídicas e de aminoácidos de *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* não retorna nenhuma homologia com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. A presença de um peptídeo sinal de secreção na extremidade N-terminal, provavelmente direciona as proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* para a via de secreção das glândulas esofágicas do nematoide, onde o peptídeo sinal é clivado, resultando em proteínas maduras, que são injetadas na célula da planta hospedeira. Estas proteínas, sem o peptídeo sinal de secreção, foram preditas como sendo localizadas no núcleo de células de eucariotos, pela análise do programa PSORT II Prediction (Nakai e Horton, 1999).

A identificação da fase da interação com a planta hospedeira em que um gene de parasitismo é expresso é importante para esclarecer em qual parte do ciclo de parasitismo ele desempenha o seu papel. Os resultados obtidos por meio das análises de qRT-PCR da cinética de expressão dos genes candidatos durante a interação arroz-nematoide mostram que eles tem expressão elevada durante o ciclo de parasitismo e com diferentes padrões.

MSP2 atinge o nível máximo de expressão aos 6 d.a.i., com redução significativa aos 10 d.a.i. e quase não detectável aos 20 d.a.i. A indução da expressão em J2 parasitas que entram nas raízes da planta tem sido observada em outros genes de parasitismo de nematoides, como *M8D05* (*MSP19*) de *M. incognita* (Xue *et al.*, 2013) e *MJ-NULG1a* de *M. javanica* (Lin *et al.*, 2013), sugerindo que eles desempenham papel importante nos estádios iniciais do processo de parasitismo. Corroborando com este resultado, Huang e colaboradores (2003), através de experimentos de hibridização *in situ* detectaram transcritos deste gene sendo expressos especificamente nas glândulas subventrais de J2 parasita de *M. incognita*, que são mais ativas nos estádios iniciais do parasitismo (Hussey, 1989).

Os genes *MSP7* e *MSP18* apresentaram elevada expressão desde as fases iniciais até as fases mais avançadas do parasitismo (de 6 d.a.i. até 20 d.a.i.). Resultados publicados anteriormente mostram, por meio de experimentos de hibridização *in situ*, que transcritos destes genes são encontrados especificamente na glândula dorsal de *M. incognita* (Huang *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2011). A atividade da glândula dorsal é mais intensa nas fases mais avançadas do parasitismo, porém existe alguma atividade nesta glândula também nas fases iniciais do parasitismo (Hussey, 1989; Hwezi e Baum, 2012).

A análise experimental da localização subcelular dos efetores depois de secretados na célula da planta hospedeira pode ser útil na determinação da sua função. Para obter um indicativo da localização subcelular das proteínas efetoras *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* em células vegetais, foram realizados experimentos de transformação transiente de células da epiderme de cebola, via biobalística, com vetores contendo as sequências dos genes candidatos (sem o peptídeo sinal de secreção) fusionados a EGFP. O produto da fusão *MSP2*-EGFP apresentou forte

sinal de fluorescência no núcleo da célula vegetal, excluindo os nucléolos, enquanto que os produtos das fusões *MSP7-EGFP* e *MSP18-EGFP* mostraram sinal de fluorescência principalmente no citoplasma e no núcleo da célula vegetal, de forma similar ao sinal de fluorescência da GFP livre.

O forte sinal fluorescência do produto da fusão *MSP2-EGFP* no núcleo da célula vegetal, juntamente com a presença na sua sequência proteica de um sinal de localização nuclear, é um indicativo de que esta proteína, depois de injetada na célula da planta hospedeira pelo nematoide, seja direcionada ao núcleo. A importação das proteínas efetoras para o núcleo da célula vegetal pode favorecer o parasitismo de diferentes maneiras, como por exemplo, modificando a expressão gênica do hospedeiro ou suprimindo as rotas de defesa da planta que são desencadeadas no núcleo (Elling *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009). Existem duas maneiras dos efetores migrarem para o núcleo da célula vegetal depois de injetados no citoplasma. O efector pode ter um peptídeo sinal que o leva a se localizar no núcleo, e alternativamente, ele pode se ligar a proteínas que são localizadas no núcleo. Até hoje, somente uma proteína de *M. incognita* foi publicada como sendo localizada no núcleo das células vegetais (Jaouannet *et al.*, 2012). Por meio de ensaios de imunolocalização foi observado que a proteína EFF1 de *M. incognita* se localiza no núcleo da célula gigante em *Arabidopsis thaliana*, enquanto que o produto da fusão desta proteína com GFP mostrou forte sinal de fluorescência no núcleo de células de tabaco agroinfiltradas (Jaouannet *et al.*, 2012).

Os efetores localizados no citoplasma provavelmente interagem com proteínas citoplasmáticas específicas do hospedeiro ou também podem afetar processos que ocorrem no núcleo da célula do hospedeiro (Hewezi e Baum, 2012). O fato de ter sido observado sinal de fluorescência no núcleo das células vegetais transformadas com o produto das fusões *MSP7-EGFP* e *MSP18-EGFP* é normal, visto que proteínas pequenas (< de 40-45 kDa) que apresentam localização citoplasmática se difundem passivamente através dos poros da membrana nuclear. Como as análises de bioinformática mostraram que as três proteínas possuem sinal de localização nuclear, novas análises devem ser realizadas para afirmar se estas proteínas podem também ser consideradas como

sendo direcionadas ao núcleo da célula vegetal. A localização destas proteínas em plantas de arroz expressando os genes *MSP7* ou *MSP18* e em células gigantes de plantas de arroz não transformadas deverá ser realizada por meio de imunolocalização para confirmar os resultados aqui obtidos.

O arroz é uma planta monocotiledônea, e poucos dados existem sobre as interações planta-nematoide ao nível molecular nesta classe de plantas. Neste contexto, o arroz é um modelo agronômico interessante para determinar o papel de proteínas efetoras de *M. incognita*.

A superexpressão na planta hospedeira de proteínas efetoras serve como um indicador do papel destas proteínas no parasitismo. Expressão constitutiva de efetores de *M. incognita* em plantas de *A. thaliana* mostraram alterações no desenvolvimento e na susceptibilidade das plantas ao ataque do patógeno. A expressão do efector 16D10 induziu o crescimento das raízes (Huang *et al.*, 2006). A expressão constitutiva do efector Mi8D05 induziu o crescimento acelerado das plantas e o florescimento precoce, porém não teve efeitos visíveis no crescimento das raízes. (Xue *et al.*, 2013). E finalmente, a expressão do gene Mi-CRT promoveu o aumento da susceptibilidade das plantas a infecção (Jaouannet *et al.*, 2013).

A expressão na planta hospedeira de RNAi com sequências complementares àquelas dos genes que se deseja silenciar no nematoide, pode mostrar a importância do gene para o estabelecimento do parasitismo e também sugerir candidatos a serem utilizados para obtenção de plantas transgênicas resistentes a nematoides. Redução de mais de 90% no número de galhas foi observada em plantas de *A. thaliana* expressando dsRNA com sequência complementar aos genes de parasitismo 16D10 ou 8D05 em ensaio de infecção por *M. incognita* (Huang *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2013). Além destes, outros estudos mostraram efeitos significativos de interferência no estabelecimento do parasitismo por *M. incognita* e por outros nematoides em plantas transgênicas expressando RNAi com sequências complementares a de genes de parasitismo do nematoide (Sindhu *et al.*, 2009; Rosso *et al.*, 2012; Jaouannet *et al.*, 2013).

As proteínas aqui estudadas não apresentam domínios conhecidos ou homologia com proteínas conhecidas em outros organismos. Para estabelecer a

função destas proteínas na planta, um primeiro passo poderia ser a busca dos alvos destas na célula vegetal. Análises de interação proteína-proteína por meio de ensaios de duplo híbrido de levedura poderão ser conduzidas para buscar respostas mais precisas sobre a interação destes efetores com proteínas específicas da planta hospedeira. Sabe-se, por exemplo, que o efector 16D10 interage com um fator de transcrição SCARECROW-like, envolvido no desenvolvimento das raízes (Huang *et al.*, 2006). Recentemente, foi mostrado que o efector 8D05 interage com uma aquaporina, que poderia ter um papel na regulação osmótica das células gigantes (Xue *et al.*, 2013). Além disso, um estudo recente de interação proteína-proteína realizado em grande escala em *A. thaliana* (Mukhtar *et al.*, 2011) indicou que efetores de patógenos, como a bactéria *Pseudomonas syringae* ou o oomiceto *Hyaloperenospora parasitica*, têm alvos comuns, sendo estes alvos um pequeno número de proteínas com alta conexão celular, chamadas “hubs”. Estas hubs são proteínas centrais na rede celular e podem potencialmente controlar um grande número de eventos moleculares da célula (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011). Este estudo mostrou que apesar de os patógenos fazerem uso de um grande número de ‘armas’, eles as usam para atacar um número bastante limitado de alvos celulares. Os patógenos atacam estas proteínas celulares altamente conectadas provavelmente para controlar a maquinaria celular do hospedeiro (Mukhtar *et al.*, 2011).

6. Conclusões e perspectivas

O pico de expressão do gene *MSP2* se dá no início do processo de parasitismo. Os genes *MSP7* e *MSP18* são expressos desde as fases iniciais até as fases mais avançadas do parasitismo.

O produto da fusão *MSP2*-EGFP apresentou forte sinal de fluorescência no núcleo da célula vegetal, enquanto que os produtos das fusões *MSP7*-EGFP e *MSP18*-EGFP mostraram sinal de fluorescência no citoplasma e no núcleo da célula vegetal. Resultados adicionais sobre a localização subcelular das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* em células vegetais serão acessados por meio da imunolocalização. Anticorpos específicos a peptídeos das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* foram encomendados e serão testados primeiramente em células das plantas transgênicas de arroz com expressão constitutiva destas proteínas. Num segundo passo, a localização das proteínas será buscada em células gigantes de plantas de arroz desafiadas com o nematoide.

Foram obtidas plantas transgênicas de arroz para expressão constitutiva das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* e de amiRNAs para silenciamento dos genes codificadores destas proteínas. As plantas transgênicas T0 já foram caracterizadas por Southern Blot e qPCR quanto ao número de cópias do transgene inserido no genoma. Foram selecionadas três linhagens para cada construção para avanço de geração e posterior realização de bioensaios.

Atualmente temos sementes T2 de três linhagens para cada construção, com uma ou duas cópias. Os próximos passos a serem dados para o andamento deste estudo são os bioensaios com as plantas transgênicas de arroz para expressão constitutiva das proteínas *MSP2*, *MSP7* e *MSP18* e de amiRNAs para silenciamento dos genes codificadores destas proteínas. Também será realizada a caracterização histológica das raízes durante a interação com o nematoide para se verificar se alterações ocorrem no estabelecimento de sítios de alimentação ou no desenvolvimento do nematoide. Este conjunto de dados permitira determinar o papel das proteínas na virulência do nematoide em arroz.

7. Referências

- ABAD, P. *et al.* Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.
- ABAD, P.; WILLIAMSON, V. M. Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. **Advances in Botanical Research**, v. 53, n.1, p. 147-192, 2010.
- BAK, A. **Caractérisation de l'interaction *Meloidogyne incognita*-riz (*Oryza spp.*) et recherche d'effecteurs de virulence**. 2010. 56 p. Dissertação (Mestrado) - Université de Strasbourg, Strasbourg, France, 2010.
- BAKHETIA, M. *et al.* RNA interference and plant parasitic nematodes. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 8, p. 362-367, 2005.
- BALDWIN, J. G.; NADLER, S. A.; ADAMS, B. J. Evolution of plant parasitism among nematodes. **Annual Review of Phytopathology**. v.42, n.1, p. 83–105, 2004.
- BELLAFIORE, S. *et al.* Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000192, 2008.
- BENDTSEN, J. D. *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783-795, 2004.
- DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.
- DAVIS, E. L. *et al.* Parasitism proteins in nematode-plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 360-366, 2008.
- de ALMEIDA ENGLER, J.; GHEYSEN, G. Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 26, n. 1, p. 17-24, 2013.
- de DEUS BARBOSA, A. E. A. *et al.* Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, v. 177, n. 5, p. 492-497, 2009.
- de WAELE, D.; ELSEN, A. Challenges in tropical plant nematology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 457-485, 2007.
- ELLING, A. A. *et al.* Active uptake of cyst nematode parasitism proteins into the plant cell nucleus. **The International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1269-1279, 2007.

FERREIRA, A.V.J. **Validação da estratégia de silenciamento gênico visando indução de resistência a *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines* em soja GM.** 2012. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

FRAGOSO, R. R. *et al.* Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 123-133, 2005.

FRAGOSO, R. R. *et al.* *Meloidogyne incognita*: molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 115-123, 2009.

GOFF, S. A. *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, n. 5565, p. 92-100, 2002.

GROSSI DE SÁ, M. **Análise funcional de genes expressos em glândula esofágica dorsal de *Meloidogyne incognita* envolvidos no fitoparasitismo.** 2011, 79 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

HAEGEMAN, A. *et al.* Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. **Molecular Plant Pathology**, 2012.

HEWEZI, T.; BAUM, T. Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 26, n. 1, p. 9-16, 2012.

HOGENHOUT, S. A. *et al.* Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 22, n. 2, p. 115-22, 2009.

HUANG, G. *et al.* 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 Science USA**, v. 103, n. 39, p. 14302-14306, 2006.

HUANG, G. *et al.* A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 16, n. 5, p. 376-381, 2003.

HUSSEY, R. S. Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes. **Annual Review of Phytopathology**. v. 7, n. 1, p. 123-141, 1989.

JAOUANNET, M. *et al.* The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 26, n. 1, p. 97-105, 2013.

JAOUANNET, M. *et al.* A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 924-931, 2012.

JONES, J. T. *et al.* Identification and functional characterization of effectors in expressed sequence tags from various life cycle stages of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 6, p. 815-828, 2009.

LIN, B. *et al.* A novel effector protein, MJ-NULG1a, targeted to giant cell nuclei plays a role in *Meloidogyne javanica* parasitism. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 26, n. 1, p. 55-66, 2013.

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.

MANELLI, G. **Analyse fonctionnelle d'effecteurs de virulence de nématodes à galles *Meloidogyne incognita* chez le riz (*Oryza sativa*)**. 2012, 62 p. Dissertação (Mestrado) - Université de Montpellier II, Montpellier, França, 2012.

MUKHTAR, M. S. *et al.* Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. **Science**, v. 333, n. 6042, p. 596-601, 2011.

NAHAR, K. *et al.* Brassinosteroids suppress rice defense against root-knot nematodes through antagonism with the jasmonate pathway. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 26, n. 1, p. 106-115, 2013.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 34-36, 1999.

OSSOWSKI, S.; SCHWAB, R.; WEIGEL, D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. **Plant Journal**, v. 53, n.1, p. 674-690, 2008.

OUWERKERK, P. B. *et al.* Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. **Planta**, v. 213, n. 3, p. 370-378, 2001.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003

ROSSO, M. *et al.* Nematode effector proteins: targets and functions in plant parasitism. . In: MARTIN F, K. S. (Ed.). **Effectors in plant microbe interactions**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p.327-354.

SALLAUD, C. *et al.* Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 8, p. 1396-1408, 2003.

SINDHU, A. S. *et al.* 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.

SMANT, G. *et al.* 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 Science USA**, v. 95, n. 9, p. 4906-4911, 1998.

SOUZA JR., J. D. A. **Análise funcional de genes de *Meloidogyne incognita* envolvidos na interação planta-nematoide**. 2011. 119 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2011. Disponível em: http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/10451/1/2011_JoseDijairAntoninoSouzaJunior_Parcial.pdf

SOUZA, D. S. L. *et al.* Ectopic expression of a *Meloidogyne incognita* dorsal gland protein in tobacco accelerates the formation of the nematode feeding site. **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 276-282, 2011.

SOUZA, D. S. L. **Seleção e avaliação funcional de fatores potencialmente envolvidos com interações entre plantas e nematoides parasitas**. 2008, 146 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2011. Disponível em: http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/3473/1/2008_DjairSantosLimaSouza_reduzida.pdf

TRUDGILL, D. L. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? **Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 26-32, 1997.

VANHOLME, B. *et al.* Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. **Gene**, v. 332, p. 13-27, 2004.

WARTHMAN, N. *et al.* Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. 1829, 2008.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 327-333, 2003.

XUE, B. *et al.* The 8D05 parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. **Phytopathology**, v. 103, n. 2, p. 175-181, 2013.

Anexos

Resumo apresentado no 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, que ocorreu no período de 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 no Guarujá, São Paulo. O pôster apresentado foi premiado com Menção Honrosa.

Rice transgenic plants for validating the functional analysis of plant-pathogenic nematode virulence genes

Mezzalana I^{1,2,3}, Beneventi M^{2,3}, Petitot AS³, Haidar R³, Chen J^{3,4}, Mieulet D⁵, Guiderdoni E⁵, Freire EVSA², Grossi-de-Sa MF², Fernandez D³

¹ *Universidade de Brasília - Departamento de Biologia Celular - Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - 70910-900 - Brasília-DF, Brazil*

² *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga - Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (final) - 70770-917 - Brasília-DF, Brazil*

³ *Institut de Recherche pour le Développement - UMR 186 IRD-UM2-Cirad "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs", 911, avenue Agropolis - 34394 - Montpellier, Cedex 5, France*

⁴ *Jiao Tong University, Shanghai, China*

⁵ *CIRAD, UMR AGAP, The RicE FUnctional GENomics platform, avenue Agropolis - 34398 - Montpellier, Cedex 05, France*

Nematodes are endo-parasites with a wide host range, encompassing mono- and dicotyledonous plant crops. Successful infection is likely achieved by effector proteins produced in the nematode esophageal gland cells and released in the host plant cells. Elucidating the role of different nematode effectors is a key to understanding the molecular basis of nematode parasitism as well as to developing new nematode control strategies. The aim of this study was to assess the functional role of three nematode esophageal gland cell proteins previously described as putative parasitism effectors. Reverse and forward genetic analyses were conducted to assess the role of the candidate proteins in plant-nematode interactions. We used rice (*Oryza sativa*) to generate transgenic plants expressing the candidate genes full-length cDNAs or artificial micro-RNAs (amiRNAs) able to silence the cognate genes in the nematode. For each gene studied, 2 amiRNAs were selected to perfectly match the candidate genes but not other nematode or plant sequences. For each construct, an average of 24 plants was recovered. Southern-blots and qPCR analyses identified single-copy gene (or amiRNA) constructs insertion in the genome of the transformed plants (T0 plants) and qPCR analysis confirmed the expression level of the gene (or amiRNA) constructs in the homozygous transgenic lines. Assessment of nematode growth and development on transgenic plants will allow selecting genes involved in establishing the compatibility with the host plant. Data obtained should significantly widen our knowledge of molecular players contributing to nematode pathogenicity, opening new avenues for nematode control strategies in rice and other crops of interest