



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência
a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja**

Bruna Medeiros Pereira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA - DF

Fevereiro de 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência
a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja**

Bruna Medeiros Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Nara Oliveira Silva Souza

Co-Orientadora: Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO No. 130/2017

BRASÍLIA - DF

Fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência
a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja**

Bruna Medeiros Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Agronomia, área de concentração: Recursos Genéticos e Melhoramento Vegetal.

APROVADO POR:

Prof. Dra. Nara Oliveira Silva Souza– UnB- FAV
(Orientadora) CPF: 033.300.726-36 e-mail: narasouza@unb.br

Prof. Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos – UnB-FAV
(Examinador interno) CPF:002.288.181-68 e-mail: jkamattos@gmail.com

Dra. Maria Eugênia Lisei de Sá Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinadora externa) CPF: 371.539.436-68 e-mail: eugenialisei@gmail.com

BRASÍLIA/DF, Fevereiro de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Bruna Medeiros

Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja. Orientadora: Dra. Nara Oliveira Silva Souza 71p.: il.

Dissertação de mestrado- Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

PEREIRA, B.M. Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja. Brasília: Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária- Universidade de Brasília. 2017. 71p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Bruna Medeiros Pereira

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte de esta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Bruna Medeiros Pereira

CPF: 11598435701

Endereço: SHIS QI 23 CONDOMÍNIO VERDE RUA MIRANTE CASA 15

CEP: 71680608

Telefone: 981585211

E-mail: bruagro6@gmail.com

BRASÍLIA/DF, Fevereiro de 2017

AGRADECIMENTO

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa de estudos.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização da infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento do projeto proposto.

A Dra. Regina Carneiro, por disponibilizar material e infraestrutura essenciais em todas as etapas que envolveram nematoides durante o projeto, pelo seu apoio e orientação.

A minha orientadora Dra. Nara de Oliveira Silva Souza, por ser paciente e por todo apoio e auxílio durante toda pós-graduação.

A minha co-orientadora Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro por estar sempre presente em todos os momentos em que precisei, com as melhores soluções para qualquer obstáculo encontrado. Pela confiança, disponibilização do projeto, pelas orientações, conselhos e incentivos em todas as etapas da pós-graduação.

A Dra. Larissa Arrais, que foi essencial no primeiro ano do meu projeto, obrigada por me ensinar com rigor, por me fazer enxergar além da imensa beleza da pesquisa, por ser tão competente e dedicada.

A Dra. Patrícia Messenberg Guimarães e a Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo por confiarem no meu trabalho e por todo apoio, conselhos e ideias que enriqueceram o mesmo.

Aos meus estimados amigos do laboratório de interação molecular planta-praga III (LPPIII) da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, que estiveram presentes nos bons e maus momentos, sempre me apoiando. Em especial as amigas Andressa Martins, Thaís Nicolini e Eliza Bellard, por sua presença todos os dias, me dando força e vontade de prosseguir, trazendo grande alegria a minha rotina e me ajudando sempre que necessitei.

A minha família e amigas (Renata Bomfim, Carolina Araújo, Aline Rigotti, Izabela Pinheiro, Joana Furtado, Raquel Bomfim e Aline Barbosa) que mesmo sendo de outras áreas de estudo sempre demonstraram interesse e transbordam um amor e um apoio incondicionais que me fazem seguir em frente em todas as etapas da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. A cultura do amendoim.....	17
3.2. Nematoides formadores de galhas no amendoim.....	18
3.3. Espécies silvestres de <i>Arachis</i>	19
3.4. Genes candidatos de <i>Arachis</i> spp. para tolerância ao nematoide de galhas.....	20
3.5. Expressão de genes candidatos em raízes transgênicas de amendoim.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Local de realização dos experimentos	24
4.2. Clonagem dos três genes candidatos.....	24
4.3. Transformação da linhagem K599 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> com os vetores binários	25
4.3.1. Eletroporação	25
4.3.2. Seleção de linhagens de <i>A. rhizogenes</i> transformadas	26
4.4. Multiplicação de <i>Meloidogyne</i> spp. em plantas de tomateiro	27
4.5. Transformação de folhas destacadas de amendoim com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	27
4.5.1. Obtenção de folhas destacadas	27
4.5.2. Preparo de pasta bacteriana para transformação	28
4.5.3. Obtenção de raízes transgênicas de amendoim	29
4.6. Inoculação de raízes de amendoim com <i>Meloidogyne arenaria</i>	30

4.7.	Obtenção de plantas compostas de soja	31
4.8.	Inoculação de raízes transgênicas de soja com <i>Meloidogyne incognita</i>	32
4.8.1.	Preparo das plantas compostas para inoculação.....	32
4.8.2.	Inoculação das raízes com <i>M. incognita</i>	33
5.	RESULTADOS	34
5.1.	Clonagem dos genes candidatos em vetor binário e introdução na linhagem silvestre de <i>A. rhizogenes</i>	34
5.2.	Análise das raízes transgênicas de amendoim inoculadas com <i>M. arenaria</i>	34
5.2.1.	Transformação com o vetor pPZP (controle)	34
5.2.2.	Transformação com o vetor pPZP-AdEXLB8	36
5.2.3.	Transformação com o vetor pPZP-AsDUF	38
5.2.4.	Transformação com o vetor pPZP-AsLIP	39
5.3.	Análise das raízes transgênicas de soja inoculadas com <i>M. incognita</i>	41
5.3.1.	Transformação com o vetor pPZP (controle)	41
5.3.2.	Transformação com o vetor pPZP-AdEXLB8	42
5.3.3.	Transformação com o vetor pPZP-AsDUF	43
6.	DISCUSSÃO	46
6.1.	Indução de raízes transgênicas em folhas destacadas de amendoim	46
6.1.1.	Inoculação de <i>M.arenaria</i> em raízes transgênicas de amendoim	48
6.2.	Indução de raízes transgênicas em plantas compostas de soja.....	50
6.2.1.	Inoculação de <i>M. incognita</i> em plantas compostas de soja	51
6.3.	Genes candidatos	52
7.	CONCLUSÕES.....	54
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXOS	66

RESUMO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) possui alta qualidade nutricional, sendo caracterizado como uma rica fonte de energia e aminoácidos. Sua produtividade é limitada por vários fatores, dentre eles a suscetibilidade ao nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria*). Em contrapartida, os parentes silvestres do amendoim (*Arachis* spp.) apresentam uma grande variabilidade genética, sendo uma fonte potencial de alelos de resistência para programas de melhoramento genético. Estudos do transcrito da interação de *M. arenaria* com espécies silvestres de amendoim resistentes, como *A. duranensis* e *A. stenosperma*, têm apontado alguns genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência ao ataque deste patógeno. A partir desses estudos, diversos genes candidatos foram selecionados e sua expressão diferencial durante a interação foi posteriormente validada. O objetivo do presente trabalho é compreender o papel biológico dos genes candidatos *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*, oriundos de espécies silvestres, na resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp), por meio de sua superexpressão em raízes transgênicas de amendoim e soja (*Glycine max*), espécies suscetíveis. Para tanto, as ORFs (Quadro de Leitura Aberta) desses genes foram clonadas no vetor binário pPZP-201BK-EGFP sob o controle do promotor de actina e introduzidas no pecíolo de folhas de amendoim ou no hipocótilo de soja, por meio de transformação com uma linhagem silvestre de *Agrobacterium rhizogenes*. Raízes transgênicas de amendoim e soja foram posteriormente inoculadas com *M. arenaria* e *M. incognita*, respectivamente, e avaliadas 60 dias após a inoculação quanto ao desenvolvimento da doença. Raízes superexpressando cada um dos três genes candidatos demonstraram, tanto em amendoim como em soja, uma redução significativa no número de galhas e formação de ovos quando comparadas com raízes transformadas somente com o vetor vazio. A análise funcional *in planta* dos efeitos fenotípicos da superexpressão de *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*, em raízes transgênicas de amendoim e de soja infectadas com diferentes espécies de *Meloidogyne*, indicam um envolvimento desses genes na resistência ao nematoide das galhas.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, transformação genética, *Meloidogyne* spp., genes de resistência.

ABSTRACT

Cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) has high nutritional quality, being a source of energy and amino acids. Peanut productivity is limited by several constraints, including susceptibility to the root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*). Conversely, peanut wild relatives (*Arachis* spp.) have high genetic variability, being a potential source of resistance alleles for breeding programs. Previous transcriptome studies of the interaction between *M. arenaria* and resistant wild peanut species, such as *A. duranensis* and *A. stenosperma*, revealed putative candidate genes involved in the resistance to *M. arenaria*. From these studies, several genes were selected and their differential expression during the interaction was further validated by qRT-PCR. The aim of the present work was to understand the biological function of three candidate genes (*AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*), isolated from wild species, in the resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) through its overexpression in transgenic roots of two susceptible species, peanut and soybean (*Glycine max*). For that, the ORFs (Open Read Frames) of the genes were cloned into the binary vector pPZP-201BK-EGFP under the control of the actin promoter and introduced into the petiole of peanut leaves or into the soybean hypocotyls, via transformation with a wild *Agrobacterium rhizogenes* strain. Transgenic roots of peanut and soybean were subsequently inoculated with *M. arenaria* and *M. incognita*, respectively, and evaluated 60 days after inoculation according to the disease development. Roots overexpressing each of the three candidate genes showed, in both peanut and soybean, a significant reduction in the number of galls and egg formation when compared to control roots transformed with the empty vector. Functional *in plant* analysis of the phenotypic effects of *AdEXLB8*, *AsDUF* and *AsLIP* overexpression in transgenic peanut and soybean roots after infection with different *Meloidogyne* species indicated that these genes are involved in root-knot nematode resistance.

Keywords: *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, genetic transformation, *Meloidogyne* spp., resistance genes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa do vetor pZP_201BK_EGFP (Chu et al., 2014) que contém entre as bordas do T-DNA os seguintes cassetes: cassete para superexpressão em plantas de genes candidatos sob o controle do promotor da Actina 2 (ACT-2) e do terminador da Nopalina Sintase (NOS) a ser clonado no sítio único de *XhoI*; cassete com o gene repórter *enhanced green fluorescent protein (eGFP)* dirigido pelo promotor 35S e terminador NOS, e o terceiro com o gene marcador de seleção higromicina fosfotransferase (*hpt*) dirigido pelo promotor da Ubiquitina (UBI3) e pelo terminador NOS..... 25
- Figura 2 - Folha destacada de amendoim acondicionada em Placa de Petri. 28
- Figura 3 - Obtenção de cultura semi-sólida (“pasta”) a partir de uma colônia da linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP. 29
- Figura 4 - Inoculação de raízes transgênicas de amendoim com *M. arenaria*. 30
- Figura 5 - Inoculação de plântulas de soja com *A. rhizogenes*. 31
- Figura 6 - Raízes transgênicas de soja obtidas sete dias após a transformação com *A. rhizogenes*. 32
- Figura 7 - Plantas compostas de soja cinco dias após o transplante para a mistura de gel com areia. 33
- Figura 8 - Mapa dos vetores utilizados: pZP_201BK_AdEXLB8 (A); pZP_201BK_AsDUF (B) e pZP_201BK_AsLIP (C). 34
- Figura 9 - Raízes transgênicas de *A. hypogaea* obtidas 90 dias após a inoculação com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* (A); raízes transgênicas sob luz ultravioleta (488 nm) (B) e sob luz branca (C). 36
- Figura 10 - Raízes transgênicas expressando eGFP transformadas com o vetor pPZP vazio sob luz ultravioleta (488 nm) (A) e sob luz branca (B). Setas indicando massa de ovo. 36
- Figura 11 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de amendoim transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-AdEXLB8. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. 38
- Figura 12 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de amendoim transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-AsDUF. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. 39
- Figura 13 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de amendoim transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-AsLIP. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. 40
- Figura 14 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e média do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em todas as raízes transformadas avaliadas. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. 41

- Figura 15 - Raízes transgênicas de *G. max* obtidas 90 dias após a inoculação com a linhagem K599 de *A. rhizogenes*; raízes transgênicas sob luz ultravioleta (488 nm) (A) e sob luz branca (B). 42
- Figura 16 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de soja transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pZPZ-*AdEXLB8*. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. 43
- Figura 17 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de soja transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pZPZ-*AsDUF*. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. 44
- Figura 18 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e média do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em todas as raízes transformadas avaliadas. 45
- Figura 19 - Raízes transgênicas de soja após 60 dias de inoculação com *M. incognita*. Raízes transformadas com o vetor pPZP (controle) (A); raízes transformadas com pZPZ-*AsDUF* (B) e com pZPZ-*AdEXLB8* (C). Setas indicando massas de ovos... 45

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Arachis* (família Fabaceae) é nativo da América do Sul, com provável centro de origem nas regiões de maior altitude no Brasil Central (Gregory et al., 1980), e distribuição natural restrita ao Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Valls e Simpson, 1994). O amendoim (*A. hypogaea*), única espécie do gênero *Arachis* cultivada em larga escala, possui sementes ricas em óleo e proteínas, que são produzidas abaixo da superfície do solo e podem ser consumidas tanto *in natura* como industrializadas. O amendoim é uma leguminosa oleaginosa de grande importância econômica, amplamente consumida na Ásia, África e Américas, e demonstra um grande potencial no combate à fome e à desnutrição em países subdesenvolvidos. A produção do amendoim é severamente afetada por diversos fitopatógenos (Vargas Gil et al., 2008), como fungos foliares e nematoides. Os nematoides fitoparasitas mais prejudiciais e mais importantes economicamente para o amendoim são os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.), em particular *M. arenaria* (Mitreva et al., 2005).

A utilização de cultivares resistentes é importante no combate aos nematoides formadores de galhas. Os genes *Mi* têm sido utilizados com sucesso no desenvolvimento de cultivares resistentes aos nematoides formadores de galhas, pois a presença desses genes diminui a infecção de diferentes espécies de *Meloidogyne* (Charchar et al., 2004). Entretanto, como provável resultado da exposição contínua em campo de plantas resistentes aos nematoides de galhas (Tzortzakakis e Gowen, 1996), algumas espécies de nematoides desenvolveram a habilidade de quebrar a resistência conferida pelos genes *Mi* fazendo-se necessário prosseguir na busca de novas fontes de resistência às populações de *Meloidogyne* spp. (Charchar et al., 2004). O surgimento de populações de nematoides virulentas em cultivares antes resistentes é motivo para preocupação, já que afeta a durabilidade dos genes de resistência utilizados (Semblat et al., 2000).

Apesar de sua importância econômica, o amendoim cultivado apresenta pequena variabilidade genética, enquanto que seus parentes silvestres apresentam uma base genética mais vasta, possuindo um grande número de alelos relacionados à resistência a serem explorados. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco ativo de germoplasma (BAG) com mais de 1.300 acessos de 79 espécies silvestres de *Arachis*, algumas identificadas como fonte de resistência para fungos e nematoides (Leal-Bertioli et al., 1999; Bertioli et al., 2000; Fávero 2004). Estudos voltados para a exploração desse

acervo genético demonstraram que *A. stenosperma*, um parente silvestre de amendoim, apresenta resistência ao nematoide das galhas *M. arenaria* por meio de indução da resposta de hipersensibilidade (RH) no local de penetração do nematoide (Proite et al., 2008). Posteriormente, o sequenciamento do transcrito de *A. stenospermae* a análise *in vitro* da expressão gênica possibilitou a identificação de um grande número de genes candidatos envolvidos na RH ao nematoide das galhas (Proite et al., 2007; Guimaraes et al., 2010; Morgante et al., 2013; Guimaraes et al., 2015). No presente trabalho, três desses genes candidatos (*AsDUF*, *AsLIP* e *AdEXLB8*) foram selecionados para estudar os efeitos de sua superexpressão na resposta ao ataque de nematoides formadores de galhas (*M. arenariae M. incognita*) em duas espécies susceptíveis de amendoim e soja (*Glycine max*).

O gene *AsDUF*, identificado em *A. stenosperma*, codifica uma proteína com função desconhecida que possui um domínio conservado denominado *Domain of Unknown Function* (DUF). *AsLIP* codifica uma proteína denominada Lipocalina em *A. stenosperma* que está envolvida na regulação dos níveis de ácido salicílico, que muitas vezes levam a RH e estão envolvidas na modulação da tolerância ao estresse oxidativo (Zinovieva et al., 2011). *AdEXLB8* codifica uma *Expansina-like B* de *A. duranensis* e está envolvida na plasticidade da parede celular em resposta a estímulos ambientais como o ataque de fitopatógenos (McQueen-Mason et al., 1992; Marowa et al., 2016). Os três genes (*AsDUF*, *AsLIP* e *AdEXLB8*) selecionados para esse estudo são positivamente regulados em resposta à infecção de *M. arenaria* em *A. stenosperma* previamente descrito por (Morgante et al., 2013).

A identificação da função biológica de genes candidatos, de potencial interesse agrônomico e que ainda não estão caracterizados, é de fundamental importância para que se possa acrescentar inovação à informação gerada pelos projetos de genômica funcional de plantas. No processo de estudo e análise do potencial biotecnológico desses genes candidatos é essencial a análise *in planta* de sua expressão. Entretanto, a análise da expressão na planta-alvo se torna complexa, longa e dispendiosa, em particular quando essa planta é recalcitrante à transformação genética, como o amendoim. Visando sanar essa limitação, foi desenvolvido no presente estudo métodos de indução de raízes transgênicas em plantas compostas de amendoim e de soja que permitem o estudo eficiente e rápido dos efeitos da superexpressão de genes candidatos (Bevan 1984; Simpson et al., 1986). Por estes métodos, raízes transgênicas são obtidas pela inoculação

da planta com linhagens silvestres de *Agrobacterium rhizogenes*, contendo um vetor binário para superexpressão em plantas dos genes candidatos. Plantas compostas são assim obtidas, nas quais a parte aérea é não-transgênica e suas raízes originais substituídas por raízes transgênicas superexpressando os genes de candidatos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos da superexpressão de três genes candidatos (*AsDUF*, *AsLIP* e *AdEXLB8*) em raízes transgênicas de amendoim (*Arachis hypogaea*) e de soja (*Glycine max*) e avaliar seu potencial como candidatos para conferir resistência ao ataque de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.).

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer uma metodologia para obtenção de raízes transgênicas em explantes alternativos (folhas destacadas) de amendoim (*A. hypogaea*) e para inoculação de nematoide das galhas (*M. arenaria.*);
- Estabelecer uma metodologia para obtenção de plantas compostas de soja (*Glycine max*) e para inoculação de nematoide das galhas (*M. incognita*);
- Transformar raízes de amendoim com três genes candidatos (*AsDUF*, *AsLIP* e *AdEXLB8*) e selecionar eventos transgênicos;
- Transformar raízes de soja com genes candidatos que demonstrarem melhores resultados em amendoim e selecionar eventos transgênicos;
- Avaliar os efeitos da superexpressão dos genes candidatos no desenvolvimento e na reprodução de *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.A cultura do amendoim

O gênero *Arachis* tem seu centro de origem na América do Sul, mais especificamente na Serra de Amambai, no limite do Mato Grosso do Sul com o Paraguai, onde ocorre a espécie mais antiga do gênero, *A. guaranitica* (Gregory et al., 1980). A difusão do amendoim cultivado (*A. hypogaea*) iniciou-se pelos indígenas para as diversas regiões da América do Sul, América Central e México. Posteriormente foi introduzido na Europa. No século XIX, o amendoim difundiu-se do Brasil para a África e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia (Hammons, 1982 citado em Wynneet al., 1991).

Atualmente, o amendoim é a quarta maior cultura oleaginosa do mundo, ficando atrás apenas da soja, da canola e do algodão (USDA-FAS, 2015). Sua importância entre as oleaginosas se dá pela alta qualidade nutricional, apresentando em sua semente 44 a 56% de óleo e 22 a 30% de proteína, de acordo com a variedade e as condições ambientais. O amendoim também participa da nutrição animal, podendo ser utilizado diretamente como pastagem, no caso do amendoim forrageiro (*A. pintoi*), ou os subprodutos da extração de seu óleo, como a torta e o farelo, utilizados como ração animal (Evangelista et al., 2004). Além disso, o amendoim contribui para a fertilidade do solo, pois possui sistema radicular com capacidade de fixar nitrogênio, podendo também ser utilizado em cultivos no sistema de rotação ou sucessão de culturas com outras espécies como, por exemplo, a cana-de-açúcar e o milho.

No Brasil, devido à expansão da cultura da soja, impulsionada pela indústria de óleo e pelas necessidades impostas pelo mercado mundial, as áreas de cultivo e a produção de amendoim foram diminuindo gradativamente, estabilizando-se na faixa de 90 a 100 mil hectares cultivados, com produtividades entre 171 e 217 mil toneladas/ano, entre os anos de 1998 a 2003, e 288 a 301 mil toneladas/ano, entre os anos de 2004 e 2006 (Conab, 2004 e 2006). A partir de 2000 o Brasil tem expandido a produção da cultura do amendoim nas regiões Sul e Sudeste, graças a expressivos aumentos de produtividade pela introdução de novas cultivares. As variedades de amendoim mais utilizadas no Brasil são originárias do Instituto Agrônomo de Campinas que mantém a atividade de pesquisa e desenvolvimento de sementes. (Conab, 2004).

3.2. Nematoides formadores de galhas no amendoim

Nas mais diferentes culturas do mundo, os nematoides fitoparasitas têm sido responsáveis por uma parcela significativa de perdas provocadas pela sua ação nociva sobre o sistema radicular, afetando a absorção e a translocação de nutrientes, alterando a fisiologia da planta. As espécies do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como os nematoides formadores de galhas, se destacam entre os principais patógenos, e representam uma ameaça à produção agrícola em escala mundial, causando perdas de até 100 milhões de dólares por ano (Ibrahim et al., 2011). Em países como os Estados Unidos e Índia chegam a causar 12% de perdas na produção (Bailey, 2002).

M. arenaria raça 1, *M. hapla*, *M. javanica* e *M. haplanaria* (Eisenbacket al., 2003) limitam o desenvolvimento das plantas de amendoim em todo o mundo, provocando sintomas como murcha, perda de cor, podridão dos ginóforos, das vagens e das raízes. A associação desses nematoides com fungos de solo ocasionam perdas de US\$ 5 bilhões por ano nos Estados Unidos (Williamson e Hussey, 1996).

Os nematoides das galhas são endoparasitas sedentários e obrigatórios, alimentam-se exclusivamente no citoplasma de células vegetais (Williamson e Gleason, 2003). Todos os nematoides do gênero *Meloidogyne* possuem parasitismo caracterizado pelo estabelecimento de sítios de alimentação permanentes que incluem células gigantes no córtex, endoderme, periciclo e o parênquima vascular da raiz da planta hospedeira (Trudgill e Blok, 2001). Os sítios de alimentação são como drenos de nutrientes produzidos por meio da fotossíntese pela planta causando deformações e bloqueando os tecidos vasculares obstruindo a translocação de água e nutrientes, limitando assim, o crescimento e o desenvolvimento da planta. Os tecidos radiculares que circundam as células gigantes formam estruturas inchadas denominadas galhas, sendo estas o principal sintoma usado para a avaliação do grau de manifestação da infecção (Gheysen e Fenoll, 2002). As galhas formadas por *M. arenaria* em amendoim podem chegar a intumescências com o dobro do diâmetro da raiz (Williamson e Hussey, 1996).

As estratégias de controle dos nematoides das galhas no amendoim constituem em rotação ou sucessão de culturas com espécies não hospedeiras ou antagonistas como *Crotalaria* spp. (crotalárias), *Mucuna* spp. (mucunas) e *Tagetes* spp. (cravos-de-defunto) (Huang et al., 1980; Huang e Charchar, 1981) e o uso de nematicidas. Infelizmente, essas práticas têm pouco efeito sobre outro nematoide do qual o amendoim também é hospedeiro *Pratylenchus* spp. e o controle químico é ineficiente e oferece riscos à saúde

humana e ao meio ambiente. Desta forma, o desenvolvimento de variedades de amendoim resistentes ao nematoide das galhas constitui uma estratégia de grande interesse para o seu controle.

3.3. Espécies silvestres de *Arachis*

O gênero *Arachis* reúne cerca de 80 espécies e está dividido em nove seções botânicas de acordo com a morfologia, distribuição geográfica e viabilidade de cruzamentos (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005). O amendoim cultivado, *A. hypogaea*, é uma espécie alotetraploide ($2n = 4x = 40$), composta de dois genomas distintos (genomas A e B), que surgiu de um eventual cruzamento entre as duas espécies silvestres diploides, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*. O resultado do cruzamento foi um híbrido estéril, o qual apresentou duplicação do número de cromossomos por evento natural, ocasionando a restauração da fertilidade (Kochert et al., 1996; Lavia et al., 2001; Jung et al., 2003; Seijo et al., 2004)

Devido à alotetraploidização, o amendoim cultivado permaneceu isolado reprodutivamente de seus parentes silvestres estreitando, dessa forma, sua base genética. Em contrapartida, as espécies diploides silvestres de *Arachis* spp. são geneticamente mais diversificadas tornando-se uma potencial fonte de alelos para o melhoramento da espécie cultivada (Hilu e Stalker, 1995). Por exemplo, a espécie selvagem *A. stenosperma* possui níveis elevados de resistência a alguns fitopatógenos, incluindo o nematoide de galhas *M. arenaria*, por meio da manifestação da Resposta de Hipersensibilidade (RH) (Proite et al., 2007). Nessa espécie, a indução de sítios de alimentação pelo nematoide foi associada a uma resposta necrótica, dificultando o desenvolvimento do nematoide, a formação de galhas e de massa de ovos (Proite et al., 2008). Estudos envolvendo bibliotecas de cDNA, macroarranjo, sequenciamento massal e análise de expressão por PCR quantitativo em *A. stenosperma* e em outras espécies silvestres de amendoim como, por exemplo, *A. duranensis*, têm apontado alguns genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência ao ataque deste patógeno (Proite et al., 2007; Guimaraes et al., 2010; 2015; Morgante et al., 2013). Alguns desses genes candidatos estão envolvidos nas vias dos ácidos salicílico (NBS-LRR, lipocalinas, resveratrol sintase) e jasmônico (patatina, alene oxido ciclase) e também relacionados ao equilíbrio hormonal (proteína responsiva a auxina - AUX/IAA e glicosil hidrolase 3 - GH3), à plasticidade celular e à sinalização

celular (tetraspanina, integrina, expansina) (Guimaraes et al., 2015). Entretanto, até o momento, não foram totalmente elucidados os mecanismos envolvidos na resposta de RH de *A. stenosperma* a *M. arenaria*.

3.4. Genes candidatos de *Arachis* spp. para tolerância ao nematoide de galhas

Um dos genes candidatos oriundo dos estudos acima mencionados é o denominado *AdEXLB8* que codifica uma Expansina-like B (EXLB) pertencente à superfamília das Expansinas que estão relacionadas com a plasticidade da parede celular, regulando a expansão e o crescimento da planta (Cosgrove, 2015). Estudos anteriores mostraram uma regulação positiva de *AdEXLB* na análise *in silico* do transcrito de raízes de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* nos primeiros estágios (3, 6 e 9 dias) após a inoculação (Guimaraes et al., 2015). Em paralelo esse gene também se mostrou regulado positivamente no transcrito de raízes de *A. duranensis* durante o processo de déficit hídrico gradual (Brasileiro et al., 2015). Análises posteriores desse gene pela técnica de RT-qPCR, tanto após a inoculação com *M. arenaria* como durante a desidratação gradual, fizeram com que este se tornasse um candidato em potencial para conferir simultaneamente resistência a *M. arenaria* e tolerância à seca (Guimaraes et al., 2015; Brasileiro et al., 2015). As Expansinas de plantas estão relacionadas com respostas a estresses abióticos e bióticos, como seca, calor, frio e infecção por fitopatógenos (Marowa et al., 2016), indicando que essas proteínas constituem um componente comum na interação planta-estresse. As Expansinas também estão envolvidas nas respostas ao estresse oxidativo (Han et al., 2015), derivadas da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Baxter et al., 2014).

Outro gene candidato escolhido para o presente estudo é o *AsDUF* que codifica uma proteína que contém domínio conservado DUF (*Domain of Unknown Function*) pertencente a uma família de função desconhecida (Gholizadeh et al., 2011). Estas proteínas são encontradas em resposta a diversos tipos de estresses bióticos, como ataques de bactérias e fungos, e abióticos, como seca e salinidade (Gholizadeh et al., 2011). A família de proteínas DUF já foi identificada em plantas de *Arabidopsis*, arroz e tomate sob diferentes condições de estresses bióticos e abióticos e podem estar relacionadas à defesa de plantas (Brunings et al., 2009; Gholizadeh et al., 2011). Uma proteína DUF isolada de *Celosia cristata* demonstrou uma elevação na atividade de enzimas que induzem a RH, tal como catalase, peroxidase, polifenol oxidase e fenilalanina amônia-

liase, quando aplicada em folhas de tabaco (Gholizadeh et al., 2011). O gene *AsDUF* foi selecionado como candidato para o presente estudo devido a resultados recentes que mostram um aumento de sua expressão aos 3, 6 e 9 dias após inoculação com *M. arenaria* em plantas de *A. stenosperma* por meio de análises de RT-qPCR (Morgante et al., 2013).

Outro gene candidato oriundo dos estudos de transcrito de *Arachis* é aquele que codifica uma Lipocalina envolvida na regulação dos níveis de ácido salicílico, que muitas vezes levam a RH, e na modulação da tolerância ao estresse oxidativo (Zinovieva et al., 2011). As Lipocalinas têm demonstrado um importante papel na remoção de moléculas potencialmente nocivas, ROS, que são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular ou derivados dos produtos da redução, conhecidas por serem induzidas por estresses relacionados a temperaturas extremas e excesso de luz (Charron et al., 2008). Recentemente, o gene *AsLIP* foi identificado como sendo positivamente regulado na análise *in silico* do transcrito de raízes de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* nos primeiros estágios (3, 6 e 9 dias) após a inoculação (Guimaraes et al., 2015). Análises por RT-qPCR validaram o perfil de expressão desse gene (Morgante et al., 2013) tornando-o um candidato potencial na resistência a *M.arenaria* em plantas transgênicas de amendoim.

3.5. Expressão de genes candidatos em raízes transgênicas de amendoim

O processo de estudo e análise do potencial biotecnológico de genes candidatos é de grande importância para a agricultura. As informações geradas pelos projetos de genômica funcional de plantas em conjunto com a análise *in planta* da expressão desses genes se tornam essenciais na busca de novas fontes de resistência. O isolamento de genes e sua transferência para espécies cultivadas de importância econômica, como o amendoim, através da transformação genética de plantas é uma estratégia promissora. Entretanto o amendoim (*A. hypogaea*) é uma planta recalcitrante à transformação genética dificultando esse processo.

Dessa forma, dentre os diferentes sistemas de transformação genética já testados em amendoim, o método selecionado para a avaliação de genes candidatos à resistência a nematoide foi o de obtenção de planta composta por meio de transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, por ser eficiente e gerar resultados rapidamente. Através desse método podemos obter plantas compostas, aonde apenas parte da planta é transformada, contornando a dificuldade da transformação genética estável.

A. rhizogenes é uma bactéria de solo gram negativa que foi identificada pela primeira vez há mais 70 anos (Riker et al., 1930; Hildelbrand, 1934; White, 1972), como agente causal da síndrome da raiz em cabeleira. *A. rhizogenes* infecta dicotiledôneas, induzindo a proliferação de raízes no local da infecção e nesse processo ocorre a transferência de fragmentos de DNA da bactéria para às raízes. A transformação mediada por linhagens silvestres de *A. rhizogenes*, onde raízes transgênicas são obtidas pela inoculação da planta com linhagens desta bactéria, é de grande importância devido a essa capacidade da espécie de transferir fragmentos de DNA para as células das plantas sem danificar a parede celular da mesma, utilizando o T-DNA (DNA de transferência). Dessa forma, um fragmento contendo o gene candidato é introduzido na planta e este será expresso em raízes transgênicas, obtendo-se plantas compostas, onde a parte aérea é não transgênica e suas raízes substituídas por raízes transgênicas expressando os genes candidatos.

Esse é um sistema rápido e eficiente de transformação que permite a análise simultânea de um grande número de genes candidatos em diversas espécies de plantas, incluindo *Glycine max* (Li et al., 2010), *Phaseolus vulgaris* (Estrada-Navarrete et al., 2006), *Prunus* spp. (Bosselut et al., 2011), *Coffea arabica* (Alpizar et al., 2006), *Medicago truncatula* (Deng et al., 2011), *Arachis hypogaea* (Liu et al., 2016). A simplicidade e eficiência desse método de transformação favorece sua aplicação em estudos de transdução de sinal, formação de nódulos em raiz, interação planta-bactéria e estudo de genes que conferem resistência a nematoide (Kosuta et al., 2008; Cai et al., 1997; Tirichine et al., 2007; Lefebvre et al., 2010). No sistema de transformação de planta composta cada raiz transgênica representa um evento de transformação independente (Kereszt et al., 2007) e múltiplas raízes transgênicas podem ser recuperadas de uma única planta ou explante.

Diferentes metodologias podem ser empregadas para a obtenção de plantas compostas. Especificamente na cultura do amendoim, Geng et al. (2012) obtiveram raízes transgênicas em 45 dias, por meio da transformação de eixos embrionários com *A. rhizogenes*, com uma taxa de eficiência de até 61%. Liu e colaboradores (2016) utilizaram a estratégia de transformação com *A. rhizogenes* na região do pecíolo de folhas destacadas de amendoim, cuja eficiência de raízes transformadas foi maior que 90%.

No sistema de transformação de planta composta cada raiz transgênica representa um evento de transformação independente (Kereszt et al., 2007), e múltiplas raízes transgênicas podem ser recuperadas de uma única planta ou explante, tornando a

transformação mediada por *A. rhizogenes* uma ferramenta importante para análise de genes candidatos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Interação Planta-Praga III (LPP-III), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) localizada em Brasília-DF, Brasil.

4.2. Clonagem dos três genes candidatos

As sequências de DNA correspondentes às ORFs (Quadro de Leitura Aberta) dos três genes candidatos alvos desse estudo, isto é, *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*, foram sintetizadas e clonadas no vetor binário de expressão em plantas pPZP_201BK_EGFP (Figura 1) pela empresa Epoch Life Science (Texas, EUA) (Chuet al., 2014). Cada uma das ORFs dos genes *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP* foi clonada no sítio único de restrição *Xho* I presente no cassete de expressão do vetor pPZP_201BK_EGFP para sua superexpressão em plantas, sob o controle do promotor da Actina 2 (*ACT-2*) de *Arabidopsis thaliana* (Yang et al., 2003) e do terminador da Nopalina Sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* (Novak et al., 2000). O vetor binário pPZP_201BK_EGFP, a partir de agora referido somente como pPZP, possui também entre as bordas de seu T-DNA outros dois cassetes: um com o gene repórter *enhanced Green Fluorescent Protein* (*eGFP*), dirigido pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35SCaMV) e terminador NOS (Novak et al., 2000) e outro com gene marcador de seleção higromicina fosfotransferase (*hpt*) de *Escherichia coli*, que confere resistência ao antibiótico higromicina, dirigido pelo promotor da Ubiquitina (UBI3) (Hajdukiewicz et al., 1994) de *A. thaliana* e o terminador NOS.

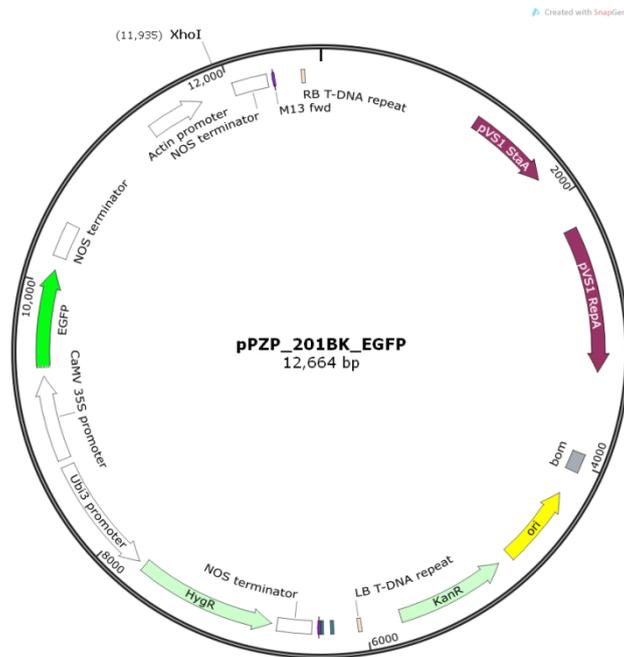


Figura 1 - Mapa do vetor pPZP_201BK_EGFP (Chu et al., 2014) que contém entre as bordas do T-DNA os seguintes cassetes: cassete para superexpressão em plantas de genes candidatos sob o controle do promotor da Actina 2 (ACT-2) e do terminador da Nopalina Sintase (NOS) a ser clonado no sítio único de *XhoI*; cassete com o gene repórter *enhanced green fluorescent protein (eGFP)* dirigido pelo promotor 35S e terminador NOS, e o terceiro com o gene marcador de seleção higromicina fosfotransferase (*hpt*) dirigido pelo promotor da Ubiquitina (UBI3) e pelo terminador NOS.

4.3. Transformação da linhagem K599 de *Agrobacterium rhizogenes* com os vetores binários

4.3.1. Eletroporação

A linhagem selvagem K599 de *A. rhizogenes*, gentilmente cedida pela Dra. Peggy Ozias-Akins (Universidade da Geórgia, EUA) foi transformada com o vetor Ppzp (vetor vazio) e com pPZP contendo os genes candidatos (*AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*), por meio de eletroporação, de acordo com Brasileiro e Carneiro (2015). Em resumo, foi adicionado 1 µL de DNA plasmidial (10 pg) em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo aproximadamente 40 µL de suspensão de *A. rhizogenes* K599 em glicerol a 10% (v/v), misturado delicadamente e incubado no gelo por cerca de dois minutos. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação resfriada a 4°C e eletroporada a 1,8 kV no eletroporador MicroPulser (BioRad, Califórnia, EUA), com capacitância de 25µF e

resistência de 400 Ω . Imediatamente após o pulso, 1 mL de meio LB (Miller, 1972) líquido foi colocado na cubeta e misturado à suspensão, com o auxílio de uma micropipeta. Novamente, essa suspensão foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foi incubada a 28°C, durante duas horas. Após esse período, diferentes volumes (50, 100 e 200 μ L) da suspensão foram distribuídos em placas de Petri contendo meio LB semi-sólido com os agentes de seleção canamicina (100 mg/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) e incubadas por dois dias, a 28 °C por 48 h, para crescimento de colônias bacterianas.

4.3.2. Seleção de linhagens de *A. rhizogenes* transformadas

Após dois dias de incubação, seis colônias isoladas, crescidas em meio seletivo, foram selecionadas aleatoriamente para confirmar a presença do vetor pPZP isolado ou contendo os genes candidatos *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*. Para confirmação da transformação, realizou-se uma PCR (Reação em cadeia da Polimerase) a partir de 1 μ L da suspensão de células de colônias isoladas diluídas em 20 μ L de H₂O MilliQ utilizando-se os iniciadores (*primers*) específicos. O DNA de cada colônia, assim obtido, foi utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando um par de *primers* que amplifica o gene *eGFP* (*eGFP_Forward* 5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3' e *eGFP_Reverse* 5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3') e outro que amplifica a região flangeadora do gene candidato (*pPZP_Forward* 5'-CTACCAGAATTTGGCTTGAC-3' e *pPZP_Reverse* 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'). A reação de PCR foi realizada com a enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen, Califórnia, EUA) em um volume final de 25 μ L, conforme instruções do fabricante. O ciclo utilizado no termociclador Master Cycler (Eppendorf, Califórnia, EUA) foi: 5 minutos a 94 C°; 35 ciclos de 30 segundos a 94 C°, 30 segundos a 50 C°, 30 segundos a 72 C°; e 7 minutos a 72 C°.

O tamanho e a qualidade do produto de amplificação (*amplicon*) para cada colônia foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). Após confirmação por PCR, uma colônia positiva para cada construção (pPZP; pPZP-*AdEXLB8*, pPZP-*AsDUF* e pPZP-*AsLIP*) foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido contendo canamicina (100 mg/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), por 16 horas, a 28 °C. Uma alíquota desse

meio de cultura foi armazenada em glicerol 15% (v/v) em congelador -80 °C para uso posterior.

4.4. Multiplicação de *Meloidogyne* spp. em plantas de tomateiro

Para a inoculação e multiplicação do nematoide da galha (*Meloidogyne* spp.) em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) variedade Santa Clara, utilizou-se solo previamente infectado com *M. arenaria* raça 1, gentilmente cedidos pela Dra. Regina Carneiro (Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF). Após 60 dias de cultivo em casa de vegetação na presença do nematoide, o sistema radicular das plantas de tomateiro foi coletado para extração dos ovos, segundo metodologia descrita por Boneti e Ferraz, (1981). Em resumo, o sistema radicular de cada indivíduo foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 cm, e triturado em liquidificador, na presença de uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) por 40 segundos. Em seguida, a suspensão passou por um conjunto de peneiras com aberturas de 0,297; 0,149 e 0,025 mm dispostas nessa ordem. Os ovos foram recuperados da peneira com abertura de 0,025 mm e transferidos para o funil de Baerman modificado, e mantidos a temperatura ambiente. Indivíduos no estágio de desenvolvimento juvenil 2 (J2) foram obtidos após eclosão dos ovos, coletados a cada dois dias e estocados a 4 °C, por oito dias até o final das coletas. Após três coletas, a quantificação dos indivíduos J2 foi realizada em uma lâmina especial denominada câmara de Peters que contém duas lâminas, sobrepostas, com um espaço ou câmara entre as duas, onde foi disposta 1 mL da suspensão de nematoides para contagem sob microscópio óptico (AxiosKop, Zeiss - Oberkochen, Alemanha). Os indivíduos foram então ressuspensos em água destilada a uma concentração de 1.000 indivíduos/mL.

4.5. Transformação de folhas destacadas de amendoim com *A. rhizogenes*

4.5.1. Obtenção de folhas destacadas

Folhas jovens completamente expandidas e contendo quatro folíolos foram destacadas de plantas de amendoim (*A. hypogaea* 'Runner IAC-866') cultivadas em casa de vegetação, após dois meses de germinação, deixando aproximadamente, 5 cm de pecíolo. Em seguida, as folhas destacadas foram acondicionadas em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo no fundo uma camada de algodão, sobre esta uma folha de papel filtro

e uma lâmina de vidro para sustentar os folíolos (Figura 2), método de folha destacada (Moraes e Salgado,1982) adaptado para transformação composta. Para manter a umidade alta na placa de Petri, o algodão e o papel de filtro eram embebidos com água destilada diariamente. No total, foram preparadas 60 placas de Petri, cada uma contendo uma folha destacada de amendoim.



Figura 2 - Folha destacada de amendoim acondicionada em Placa de Petri.

4.5.2. Preparo de pasta bacteriana para transformação

Uma colônia de *A. rhizogenes* da linhagem K599, previamente armazenada em congelador a -80°C e transformada com o vetor binário pPZP (vetor vazio) ou contendo um dos três genes candidatos (pPZP-*AdEXLB8*, pPZP-*AsDUF* ou pPZP-*AsLIP*), foi cultivada em placa de Petri contendo meio LB semi-sólido contendo estreptomicina (100 mg/mL) e canamicina (100 mg/mL) a 28°C por 48 horas. Em seguida, uma colônia isolada foi novamente cultivada em meio LB semi-sólido com os mesmos antibióticos, por 48 horas adicionais. Esta cultura foi ressuspensa em meio LB líquido contendo glicerol 50% (v/v) e espalhada em placa de Petri contendo meio LB semi-sólido com os mesmos antibióticos. Após crescimento a 28°C por 16 horas, toda cultura bacteriana crescida na placa (chamada aqui de “pasta”) foi então coletada com auxílio de uma alça de Drigalski (Figura 3) e utilizada para inoculação do pecíolo das folhas de amendoim ou de hipocótilo de soja.



Figura 3 - Obtenção de cultura semi-sólida (“pasta”) a partir de uma colônia da linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP.

4.5.3. Obtenção de raízes transgênicas de amendoim

Após o preparo das placas, a inoculação das folhas destacadas de amendoim com a linhagem selvagem de *A. rhizogenes* K599 contendo os quatro diferentes vetores binários (pPZP; pPZP-*AdEXLB8*, pPZP-*AsDUF* ou pPZP-*AsLIP*) foi realizada por meio de três ferimentos na região do pecíolo, feitos com alfinete previamente esterilizado e embebido na respectiva “pasta” bacteriana. Vinte folhas foram inoculadas para cada construção. Em seguida, as folhas foram acondicionadas em condições de alta umidade nas placas de Petri e a região do ferimento coberta com algodão umedecido com água destilada. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas, por 20 dias até o crescimento das raízes transgênicas (raízes em cabeleira). As raízes foram então avaliadas por observação da fluorescência da proteína eGFP no comprimento de onda de 488 nm em um microscópio estereoscópio de fluorescência Leica M205 FA (Leica Microsystem, Alemanha). Folhas destacadas com raízes expressando pouca ou nenhuma fluorescência (consideradas como não-transgênicas) foram descartadas. Folhas com todas as raízes expressando a fluorescência de eGFP foram selecionadas para posterior inoculação com nematoide. Quando uma mesma folha destacada possuía ambas as raízes eGFP positiva e negativa, aquelas que não apresentaram fluorescência (não-transgênicas) foram excisadas, as que apresentaram fluorescência (transgênicas) foram mantidas. O pecíolo e as raízes das folhas destacadas selecionadas foram cobertos com vermiculita (Figura 4) de granulação média (5 a 8 mm),

previamente esterilizada por autoclavagem, e as folhas destacadas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas, durante todo o bioensaio.

4.6. Inoculação de raízes de amendoim com *Meloidoyne arenaria*

A inoculação de cada folha destacada com *M. arenaria* foi realizada utilizando uma seringa de 5 mL (Figura 4) contendo 1 mL de uma suspensão de 1.000 indivíduos J2. O inoculo foi espalhado de forma homogênea sobre a região coberta com vermiculita (pecíolo e raízes; Figura 4). Após inoculação, as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

Após 60 dias da inoculação, as raízes foram removidas cuidadosamente da vermiculita, lavadas em água corrente e examinadas em microscópio estereoscópico de fluorescência Leica M205 FA (Leica Microsystem, Alemanha). As raízes transgênicas (emitindo fluorescência eGFP) foram coletadas com o auxílio de lâmina de bisturi, pesadas, armazenadas em placas de Petri contendo água destilada e avaliadas quanto à presença de galhas e massas de ovos. Para tanto, as raízes foram coradas com Floxina B (15 mg/L) por 20 minutos para destaque das massas de ovos de acordo com Taylor e Sasser, 1978. Em seguida, a contagem do número de massas de ovos e de galhas foi realizada em um microscópio óptico (Axioskop, Zeiss - Oberkochen, Alemanha). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente para comparação das médias pelo Teste t de Student ($p < 0,05$) e a comparação entre todos os dados foi realizada utilizando análise de variância ANOVA ($p < 0,05$).



Figura 4 - Inoculação de raízes transgênicas de amendoim com *M. arenaria*.

4.7. Obtenção de plantas compostas de soja

Para a obtenção de raízes transgênicas de soja (*Glycine max*) por meio da inoculação com a linhagem selvagem K599 de *A. rhizogenes* foi utilizada a cultivar ‘Williams 82’, um genótipo modelo para estudos com *Meloidogyne* spp. e amplamente utilizado em estudos genéticos. Foram germinadas 60 sementes de soja em papel germinativo dentro de placas de Petri de vidro (150x25mm). As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. Após quatro dias de germinação, a inoculação das plântulas de soja com a linhagem selvagem K599 de *A. rhizogenes* contendo os quatro diferentes vetores binários (pPZP; pPZP-AdEXLB8, pPZP-AsDUF ou pPZP-AsLIP) foi realizada por meio de ferimentos feitos na região paralela ao feixe vascular do hipocótilo (Figura 5), com alfinete estéril previamente embebido na “pasta” bacteriana. Vinte plântulas foram inoculadas para cada construção.

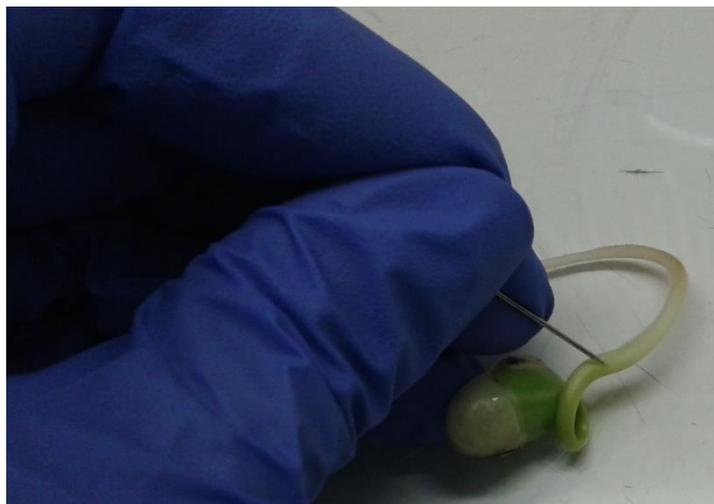


Figura 5 - Inoculação de plântulas de soja com *A. rhizogenes*.

Em seguida, as plântulas foram dispostas novamente nas placas de Petri e cobertas com papel filtro umedecido com água. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas por, aproximadamente, sete dias até o aparecimento das primeiras raízes transformadas (Figura 6). As raízes das plantas compostas assim obtidas foram então selecionadas por observação da fluorescência da proteína eGFP no comprimento de onda de 488 nm em um microscópio estereoscópico de fluorescência (Leica Mycosistem M205 FA). Raízes não-transformadas ou de plantas compostas sem raízes transformadas foram descartadas.



Figura 6 - Raízes transgênicas de soja obtidas sete dias após a transformação com *A. rhizogenes*.

4.8. Inoculação de raízes transgênicas de soja com *Meloidogyne incognita*

4.8.1. Preparo das plantas compostas para inoculação

Após a seleção, as plantas compostas (duas semanas após a transformação com *A. rhizogenes*) com raízes transformadas (expressando eGFP) foram transplantadas para copos de plástico de 300 mL contendo a mistura de areia com gel e mantidas em casa de vegetação (Figura 7). A mistura de areia com gel foi previamente preparada pela dissolução de 12 g de gel para plantio Forth (polímero hidroretentor, Tecnutri, Brasil) em 4 L de água e, após algumas horas, batido no liquidificador e misturado a 12 kg de areia fina autoclavada (diâmetro dos grãos 0,1 mm). A mistura foi transferida para os copos após secagem total que durou aproximadamente uma semana.



Figura 7 - Plantas compostas de soja cinco dias após o transplante para a mistura de gel com areia.

4.8.2. Inoculação das raízes com *M. incognita*

Uma semana após o transplante para a mistura gel e areia, cada planta composta foi inoculada utilizando uma seringa de 5 mL contendo 1 mL com 1.000 indivíduos J2 de *M. incognita*. Após inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

Após 60 dias da inoculação, as raízes foram removidas cuidadosamente, lavadas em água corrente e examinadas em microscópio estereoscópico de fluorescência Leica M205 FA (Leica Microsystem, Alemanha). As raízes transgênicas (expressando eGFP) foram coletadas, pesadas e armazenadas em placas de Petri para avaliação quanto à presença de galhas e massas de ovos. Posteriormente, as raízes foram coradas com Floxina B (15 mg/L) por 20 minutos para destaque das massas de ovos, de acordo com Taylor e Sasser (1978). Em seguida, a contagem do número de massas de ovos e de galhas foi realizada em um microscópio óptico (AxiosKop, Zeiss - Oberkochen, Alemanha). O bioensaio de inoculação foi repetido nas mesmas condições para analisar um número maior de indivíduos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente para comparação das médias pelo Teste t de Student e a comparação entre todos os dados foi realizada utilizando ANOVA.

5. RESULTADOS

5.1. Clonagem dos genes candidatos em vetor binário e introdução na linhagem silvestre de *A. rhizogenes*

As ORFs dos genes *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP* foram clonadas com sucesso no sítio *XhoI* do vetor binário pPZP, gerando os vetores pPZP-*AdEXLB8*, pPZP-*AsDUF* e pPZP-*AsLIP*, respectivamente (Figura 8). Esses três vetores e o vetor vazio pPZP foram posteriormente introduzidos na linhagem K599 de *A. rhizogenes*. A confirmação da transformação das bactérias foi realizada por meio de PCR de colônia (dados não mostrados).

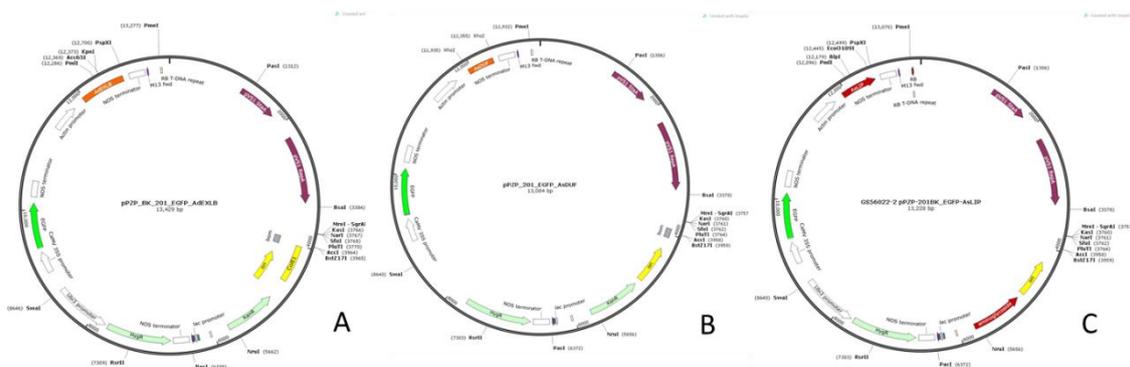


Figura 8 - Mapa dos vetores utilizados: pPZP_201BK_*AdEXLB8* (A); pPZP_201BK_*AsDUF* (B) e pPZP_201BK_*AsLIP* (C).

5.2. Análise das raízes transgênicas de amendoim inoculadas com *M. arenaria*

5.2.1. Transformação com o vetor pPZP (controle)

Vinte folhas destacadas de amendoim foram inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP (vetor vazio). Destas, 18 folhas destacadas (90%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, 20 dias após a transformação, com uma média de seis raízes por folha. A análise em microscópio de fluorescência mostrou que todas as raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. Esses resultados indicam que todas as raízes desenvolvidas a partir da inoculação de folhas destacadas de amendoim com a linhagem selvagem de *A. rhizogenes* foram transformadas com o vetor binário pPZP e expressam transgene *GFP*.

A alta eficiência de transformação obtida (90%) valida a metodologia de transformação de folhas destacadas desenvolvida no presente trabalho. As 18 folhas destacadas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. arenaria*.

Após 60 dias da inoculação com *M. arenaria*, apenas as raízes transgênicas (ainda expressando eGFP) foram avaliadas (Figuras 9 e 10) pela contagem de galhas e massas de ovos utilizando microscópio óptico. Para destaque das massas de ovos, as raízes foram coradas com Floxina B. Das 18 folhas destacadas inoculadas com *M. arenaria*, 10 (55%) possuíam raízes transgênicas, isto é, que emitiam fluorescência da proteína eGFP e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção com nematoides. Essa redução de entre o número de folhas destacadas apresentando raízes fluorescentes aos 20 dias em relação a esse número aos 90 dias após a transformação com *A. rhizogenes* é, provavelmente, relacionada ao surgimento de falsos negativos nesses 70 dias, isto é, raízes transgênicas em que não foi possível visualizar a fluorescência da eGFP. A fluorescência de eGFP pode ser ocultada em raízes maduras devido à diminuição da densidade celular e ao engrossamento do tecido, o que dificulta a visualização de eGFP em raízes em cabeleira. Cada uma das dez folhas destacadas continha em torno de seis raízes transgênicas pesando em média 0,24g (Figura 9 e anexo 1). Raízes transformadas com o vetor pPZP apresentaram uma média de 18,9 galhas/g de raiz e 13 massas de ovos/g de raiz, (Figuras 11 a 13). Observou-se uma variação do número total de galhas desenvolvidas em cada raiz transgênica avaliada (variando de 9,52 a 26,67 galhas/g) ou da massa de ovos (variando de 8,00 a 17,86 massas de ovos/g), indicando que existe um efeito do evento transgênico no desenvolvimento da doença.

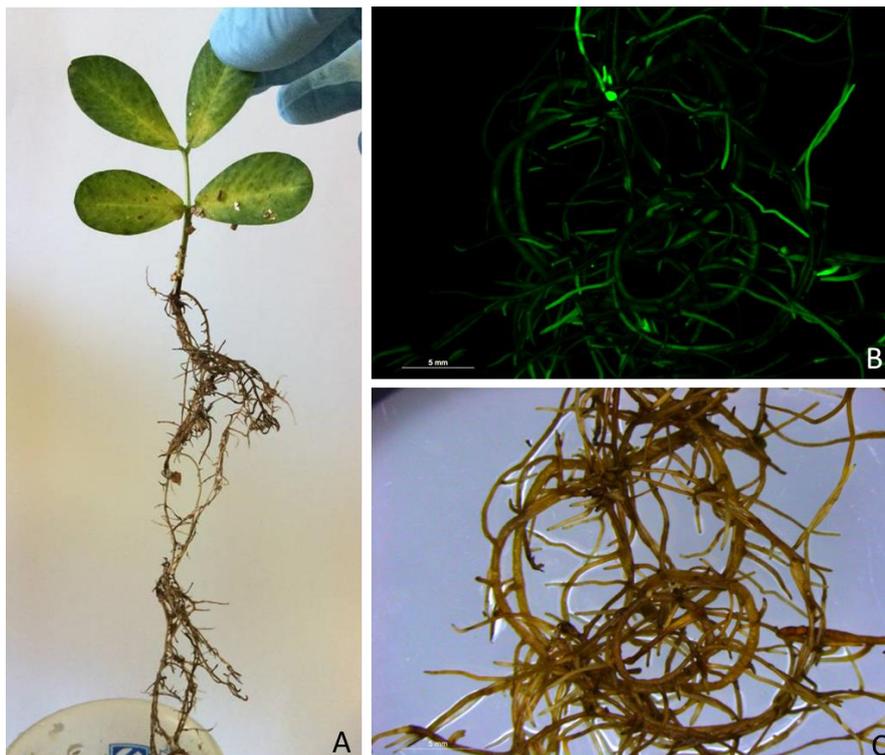


Figura 9 - Raízes transgênicas de *A. hypogaea* obtidas 90 dias após a inoculação com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* (A); raízes transgênicas sob luz ultravioleta (488 nm) (B) e sob luz branca (C).

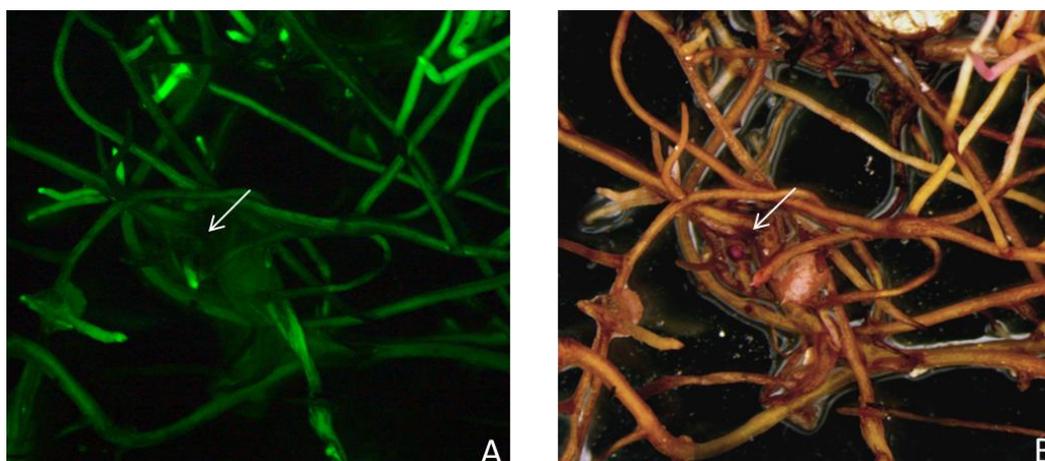


Figura 10 - Raízes transgênicas expressando eGFP transformadas com o vetor pPZP vazio sob luz ultravioleta (488 nm) (A) e sob luz branca (B). Setas indicando massa de ovo.

5.2.2. Transformação com o vetor pPZP-AdEXLB8

Das vinte folhas destacadas de amendoim inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP-AdEXLB8, 19 (95%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, 20 dias após a transformação. Como para o controle com o vetor vazio, a análise em microscópio de fluorescência mostrou que todas

as raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. Tanto a média de raízes transgênicas por folha destacada (seis raízes/folha) como a eficiência de transformação (95%) foram muito próximas àquelas obtidas em folhas transformadas com o vetor vazio. Esses resultados indicam que a presença do gene *EXLB8* não influenciou o número médio de raízes por folha destacada e a eficiência de transformação. As 19 folhas destacadas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. arenaria*.

Após 60 dias da inoculação com *M. arenaria*, as raízes desenvolvidas a partir das folhas destacadas foram novamente avaliadas quanto à presença de fluorescência. Das 19 folhas destacadas inoculadas com *M. arenaria*, 14 (73%) possuíam raízes transgênicas, isto é, que emitiam fluorescência da proteína eGFP e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção com nematoides. Cada uma das 14 folhas destacadas avaliadas continha em torno de seis raízes transgênicas pesando em média 0,24g, demonstrando que a superexpressão do transgene *AdEXLB8* não influenciou o peso e o número médio de raízes por folha destacada, quando comparado com as raízes transformadas com o vetor vazio (anexo 1). Raízes transformadas com pPZP-*AdEXLB8* apresentaram uma média de 0,26 galhas/g e 0,21 massas de ovos/g (Figura 11). Assim como na transformação com o vetor vazio, observou-se uma variação entre indivíduos (eventos), com valores variando de 0 a 3,57 galhas/g de raiz e de 0 a 2,54 massas de ovos/g de raiz (anexo 1). De acordo com o Teste t Student ($p < 0,05$), raízes superexpressando o transgene *AdEXLB8* diferiram significativamente das raízes controle (vetor vazio) em relação ao número de galhas/g ($p = 6,74657E-07$) e massas de ovos/g ($p = 2,78035E-07$). Esses resultados indicam que a superexpressão *in planta* de *AdEXLB8* conferiu uma redução de 97,53% e 98,40% no número de galhas e massas de ovos, respectivamente, e uma drástica diminuição no desenvolvimento da infecção causada pelo nematoide em comparação com o controle sem *AdEXLB8* (vetor vazio; Figura 11).

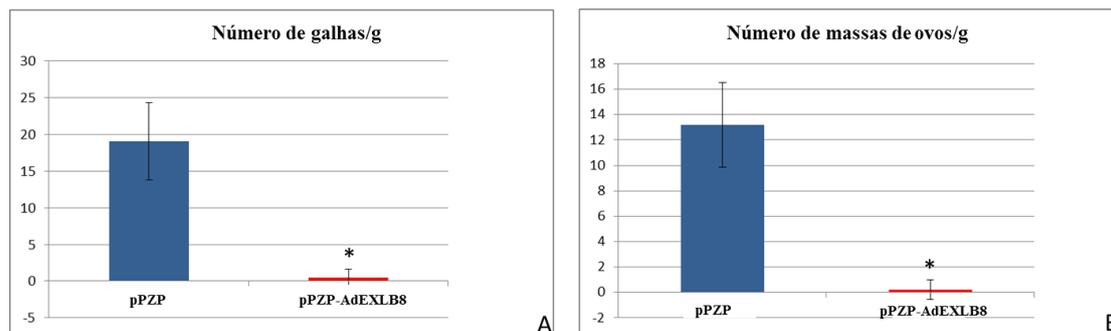


Figura 11 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de amendoim transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-AdEXLB8. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos.

5.2.3. Transformação com o vetor pPZP-AsDUF

Das vinte folhas destacadas de amendoim inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP-AsDUF, 16 (80%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, 20 dias após a transformação. Como para o controle com o vetor vazio, a análise em microscópio de fluorescência mostrou que todas as raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. Tanto a média de raízes transgênicas por folha destacada (seis raízes/folha) como a eficiência de transformação (80%) foram muito próximas àquelas obtidas em folhas transformadas com o vetor vazio. Esses resultados indicam que a presença do gene *AsDUF* não influenciou o número médio de raízes por folha destacada e a eficiência de transformação. As 16 folhas destacadas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. arenaria*.

Após 60 dias da inoculação com *M. arenaria*, as raízes desenvolvidas a partir das folhas destacadas foram novamente avaliadas quanto à presença de fluorescência. Das 16 folhas destacadas inoculadas com *M. arenaria*, 10 (62%) possuíam raízes transgênicas, isto é, que emitiam fluorescência da proteína eGFP e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção com nematoides. Cada uma das 10 folhas destacadas avaliadas continha em torno de seis raízes transgênicas pesando em média 0,28g, demonstrando que a superexpressão do transgene *AsDUF* não influenciou o peso e o número médio de raízes por folha destacada, quando comparado com as raízes transformadas com o vetor vazio (anexo 1). Raízes transformadas com pPZP-AsDUF apresentaram uma média de 2,44 galhas/g e 2,15 massas de ovos/g (Figura 12). Assim como na transformação com o vetor vazio, observou-se uma variação entre indivíduos (eventos), com valores variando

de 0 a 5,71 galhas/g de raiz e de 0 até 5,00 massas de ovos/g de raiz (anexo 1). De acordo com o Teste t Student ($p < 0,05$), raízes superexpressando o transgene *AsDUF* diferiram significativamente das raízes controle em relação ao número de galhas/g ($p = 9,11463E-07$) e massas de ovos/g ($p = 1,96593E-07$). Não houve diferença significativa entre as raízes transformadas com o vetor pPZP-*AsDUF* e com o vetor pPZP-AdEXLB pela análise de variância (ANOVA). Esses resultados indicam que a superexpressão *in planta* de *AsDUF* conferiu uma redução de 87,17% e 83,67% no número de galhas e massas de ovos, respectivamente, e uma drástica diminuição no desenvolvimento da infecção causada pelo nematoide em comparação com o controle sem *AsDUF* (Figura 12).

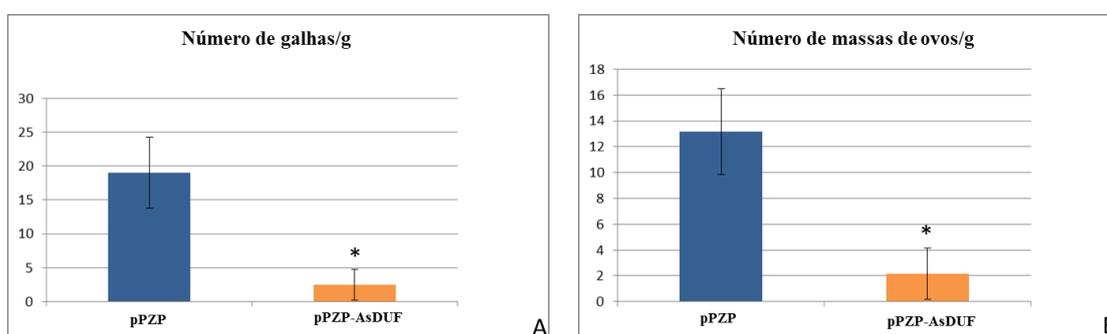


Figura 12 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de amendoim transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-*AsDUF*. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos.

5.2.4 Transformação com o vetor pPZP-*AsLIP*

Das vinte folhas destacadas de amendoim inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP-*AsLIP*, 17 (85%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, 20 dias após a transformação. Como para o controle com o vetor vazio, a análise em microscópio de fluorescência mostrou que todas as raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. Tanto a média de raízes transgênicas por folha destacada (seis raízes/folha) como a eficiência de transformação (85%) foram muito próximas àquelas obtidas em folhas transformadas com o vetor vazio. Esses resultados indicam que a presença do gene *AsLIP* não influenciou o número médio de raízes por folha destacada e a eficiência de transformação. As 17 folhas destacadas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. arenaria*.

Após 60 dias da inoculação com *M. arenaria*, as raízes desenvolvidas a partir das folhas destacadas foram novamente avaliadas quanto à presença de fluorescência. Das 17 folhas destacadas inoculadas com *M. arenaria*, 12 (70%) possuíam raízes transgênicas e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção com nematoides. Cada uma das 12 folhas destacadas avaliadas continha em torno de seis raízes transgênicas pesando em média 0,27g, demonstrando que a superexpressão do transgene *AsLIP* não influenciou o peso e o número médio de raízes por folha destacada, quando comparado com as raízes transformadas com o vetor vazio (anexo 1). Raízes transformadas com pPZP-*AsLIP* apresentaram uma média de 8,04 galhas/g e 6,17 (Figura 13). Assim como na transformação com o vetor vazio, observou-se uma grande variação entre indivíduos (eventos), com valores variando de 4,00 a 10,00 galhas/g de raiz e de 3,70 a 9,38 massas de ovos/g de raiz (anexo 1). De acordo com o Teste t Student ($p < 0,05$), raízes superexpressando o transgene *AsLIP* diferiram significativamente das raízes controle (vetor vazio) em relação ao número de galhas/g ($p = 6,04221E-05$) e massas de ovos/g ($p = 4,98708E-05$). Foi observada uma diferença significativa entre as raízes transformadas com o vetor pPZP-*AsLIP* em comparação com as raízes transformadas com os vetores pPZP-AdEXLB e pPZP-AsDUF pela análise de variância (ANOVA). Esses resultados indicam que a superexpressão *in planta* de *AsLIP* conferiu uma redução de 57,76% e 46,84% no número de galhas e massas de ovos, respectivamente, e uma diminuição no desenvolvimento da infecção causada pelo nematoide em comparação com o controle sem *AsLIP* (Figura 13).

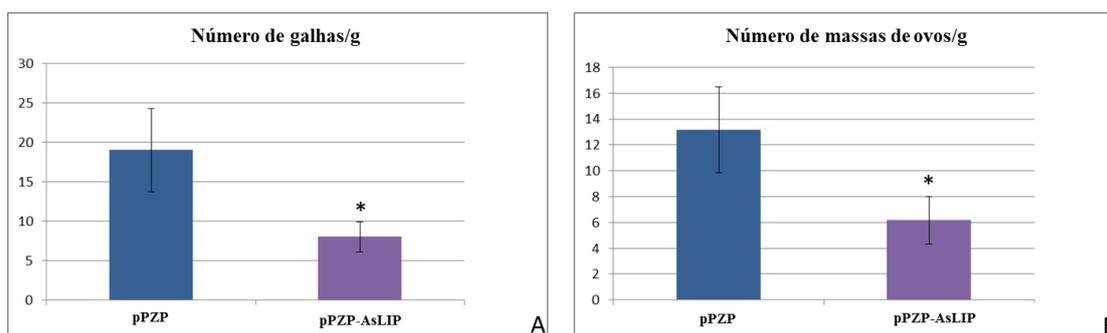


Figura 13 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de amendoim transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-*AsLIP*. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos.

Como foi observado, as raízes transgênicas superexpressando os genes candidatos diferiram significativamente das raízes controlereducindo a infecção causada pelos nematoides (Figura 14).

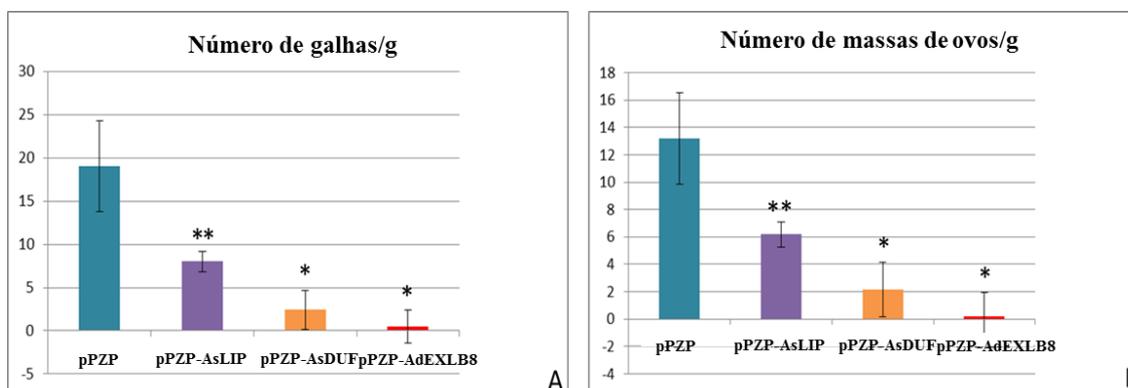


Figura 14 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e média do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em todas as raízes transformadas avaliadas. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos.

5.3. Análise das raízes transgênicas de soja inoculadas com *M. incognita*

5.3.1. Transformação com o vetor pPZP (controle)

Os dados foram descritos baseados no total de plantas dos dois bioensaios realizados. Quarenta plântulas de soja foram inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP (vetor vazio). Destas, 28 plantas (70%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, sete dias após a transformação. A análise em microscópio de fluorescência mostrou que 60% das raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. As 28 plantas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. incognita*.

Após 60 dias da inoculação com *M. incognita*, apenas as raízes transgênicas (ainda expressando eGFP) foram avaliadas (Figura 15) pela contagem de galhas e massas de ovos utilizando microscópio óptico. Para destaque das massas de ovos, as raízes foram coradas com Floxina B. Das 28 plantas inoculadas, 19 (67%) possuíam raízes transgênicas, e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção com nematoides. Cada uma das dezenove plantas continha em torno de 60% de raízes transgênicas pesando em média 2,98g (anexo 2). Raízes transformadas com o vetor pPZP apresentaram uma média de 16,09 galhas/g e 15,42 massas de ovos/g (Figuras 16 a 18). Observou-se

variação do número total de galhas desenvolvidas em cada raiz transgênica avaliada (variando de 10,32 a 34,62 galhas/g de raiz), e de massas de ovos (variando de 10,03 a 31,25 massas de ovos/g de raiz).

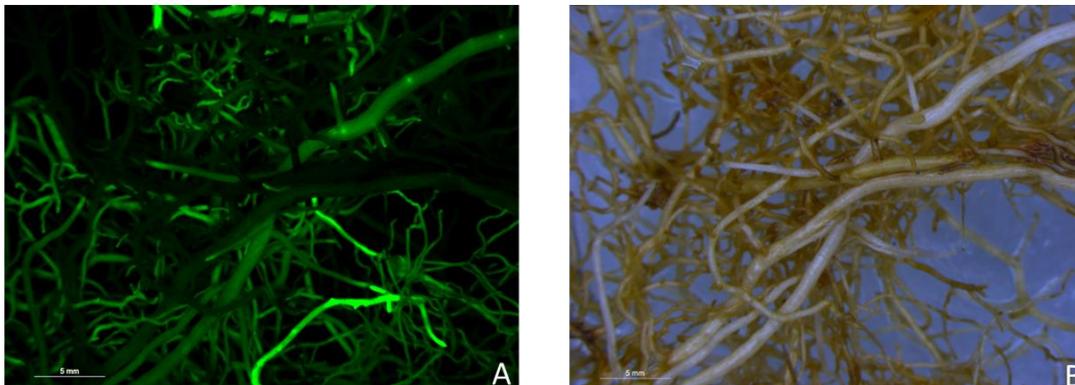


Figura 15 - Raízes transgênicas de *G.max* obtidas 90 dias após a inoculação com a linhagem K599 de *A. rhizogenes*; raízes transgênicas sob luz ultravioleta (488 nm) (A) e sob luz branca (B).

5.3.2. Transformação com o vetor pPZP-AdEXLB8

Das quarenta folhas plântulas de soja inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP-AdEXLB8, 30 (75%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, sete dias após a transformação. Como para o controle com o vetor vazio, a análise em microscópio de fluorescência mostrou que aproximadamente 60% das raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. Tanto a média de raízes transgênicas por planta (60%) como a eficiência de transformação (75%) foram muito próximas àquelas obtidas em plantas transformadas com o vetor vazio. As 30 plantas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. incognita*.

Após 60 dias da inoculação, as raízes foram novamente avaliadas quanto à presença de fluorescência. Das 30 plantas inoculadas, 21 (70%) possuíam raízes transgênicas, isto é, que emitiam fluorescência da proteína eGFP e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção com nematoides. Cada uma das 21 plantas avaliadas continha em torno de 60% de raízes transgênicas pesando em média 3,60g, demonstrando que a superexpressão do transgene *AdEXLB8* não influenciou o peso e o número médio de raízes por planta, quando comparado com as raízes transformadas com o vetor vazio (anexo 2). Raízes transformadas com pPZP-AdEXLB8 apresentaram uma média de 0,68 galhas/g e 0,66 massas de ovos/g (Figura 16). Assim como na transformação com o vetor

vazio, observou-se uma variação entre indivíduos, com valores variando de 0 a 1,34 galhas/g de raiz e de 0 a 1,79 massas de ovos/g de raiz (anexo 2). De acordo com o Teste t Student ($p < 0,05$), raízes superexpressando o transgene *AdEXLB8* diferiram significativamente das raízes controle em relação ao número de galhas/g ($p = 1,79536E-09$) e massas de ovos/g ($p = 2,17839E-10$). Esses resultados indicam que a superexpressão *in planta* de *AdEXLB8* conferiu uma redução de 95,77% e 95,90% no número de galhas e massas de ovos, respectivamente, e uma drástica diminuição no desenvolvimento da infecção causada pelo nematoide em comparação com o controle sem *AdEXLB8* (Figura 19 A e C).

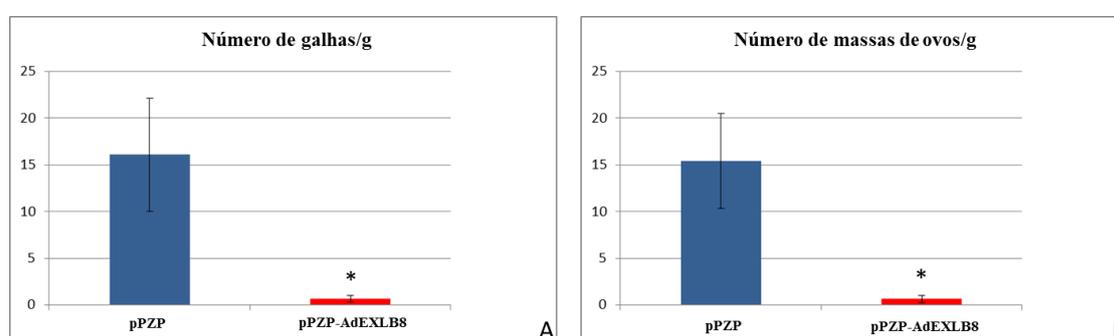


Figura 16 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de soja transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-AdEXLB8. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos.

5.3.3. Transformação com o vetor pPZP-AsDUF

Das quarenta plântulas de soja inoculadas com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* contendo o vetor binário pPZP-AsDUF, 25 (62%) desenvolveram raízes com fenótipo típico de raiz em cabeleireira, sete dias após a transformação. Como para o controle com o vetor vazio, a análise em microscópio de fluorescência mostrou que aproximadamente 60% das raízes com esse fenótipo apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. Tanto a média de raízes transgênicas por planta (60%) como a eficiência de transformação (62%) foram próximas àquelas obtidas em plantas transformadas com o vetor vazio. As 25 plantas contendo raízes transgênicas foram então inoculadas com *M. incognita*.

Após 60 dias da inoculação, as raízes desenvolvidas a partir das folhas destacadas foram novamente avaliadas quanto à presença de fluorescência. Das 25 plantas inoculadas com *M. incognita*, 15 (60%) possuíam raízes transgênicas, isto é, que emitiam fluorescência da proteína eGFP e foram, portanto, selecionadas para análise da infecção

com nematoides. Cada uma das 15 plantas avaliadas continha em torno de 60% das raízes transgênicas pesando em média 3,63g, demonstrando que a superexpressão do transgene *AsDUF* não influenciou o peso e o número médio de raízes por planta, quando comparado com as raízes transformadas com o vetor vazio (anexo 2). Raízes transformadas com pPZP-*AsDUF* apresentaram uma média de 2,39 galhas/g e 2,52 massas de ovos/g (Figura 17). Assim como na transformação com o vetor vazio, observou-se uma grande variação entre indivíduos (eventos), com valores variando de 0 a 3,52 galhas/g de raiz e de 0 a 3,49 massas de ovos/g de raiz (anexo 2). De acordo com o Teste t Student ($p < 0,05$), raízes superexpressando o transgene *AsDUF* diferiram significativamente das raízes controle em relação ao número de galhas/g ($p = 8,06661E-09$) e massas de ovos/g ($p = 1,34137E-09$). Esses resultados indicam que a superexpressão *in planta* de *AsDUF* conferiu uma redução de 85,15% e 84,29% no número de galhas e massas de ovos, respectivamente, e uma drástica diminuição no desenvolvimento da infecção causada pelo nematoide em comparação com o controle sem *AsDUF* (Figuras 17 e 19 A e B). Não houve diferença significativa entre as raízes transformadas com o vetor pPZP-*AsDUF* e com o vetor pPZP-AdEXLB pela análise de variância (ANOVA).

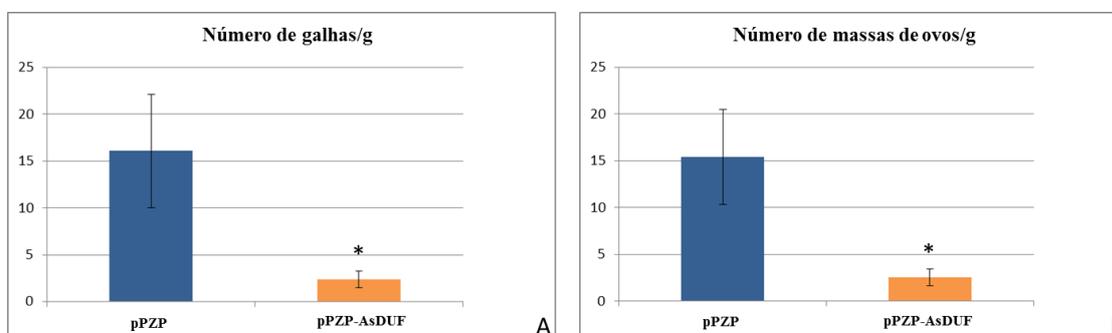


Figura 17 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em raízes de soja transformadas com vetor vazio (pPZP) e com o vetor pPZP-*AsDUF*. O * indica que houve diferença significativa entre os tratamentos.

Como foi observado as raízes transgênicas superexpressando os genes de candidatos diferiram significativamente das raízes controle reduzindo a infecção causada pelos nematoides (Figuras 18 e 19).

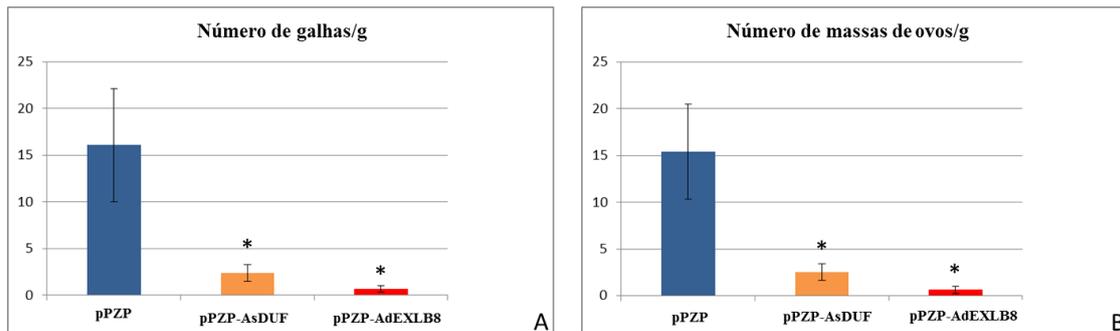


Figura 18 - Média do número de galhas por grama de raiz (A) e média do número de massas de ovos por grama de raiz (B) em todas as raízes transformadas avaliadas.

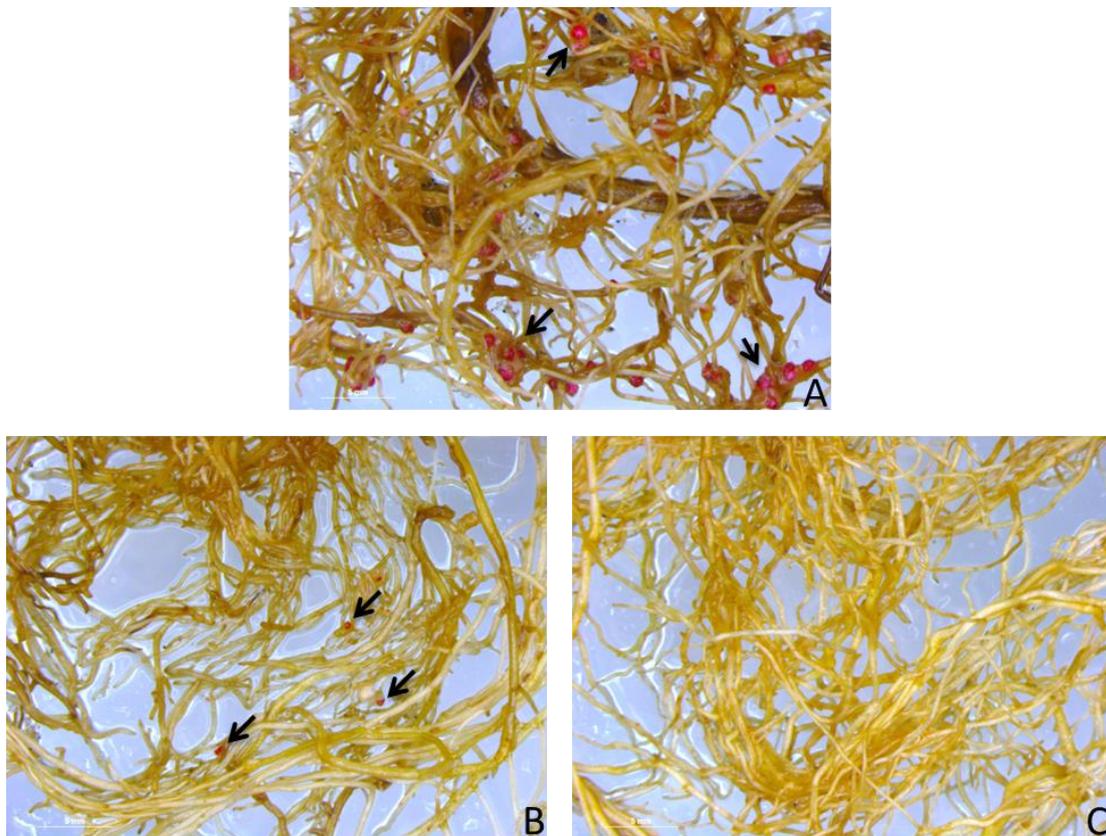


Figura 19 - Raízes transgênicas de soja após 60 dias de inoculação com *M. incognita*. Raízes transformadas com o vetor pPZP (controle) (A); raízes transformadas com pPZP-AsDUF (B) e com pPZP-AdEXLB8 (C). Setas indicando massas de ovos.

6. DISCUSSÃO

6.1. Indução de raízes transgênicas em folhas destacadas de amendoim

A eficiência de transformação de amendoim com a linhagem selvagem K599 de *A. rhizogenes* aqui obtida (90%) pela inoculação de pecíolos em folhas destacadas foi maior do que a eficiência média previamente observada para a obtenção de plantas compostas de amendoim (Akasaka et al., 1998; Geng et al., 2012; Chu et al., 2014). Para se obter uma transformação com *A. rhizogenes* de alta eficiência (acima de 80%) alguns parâmetros devem ser considerados como: tipo de explante; densidade e estágio de crescimento das células bacterianas; linhagem de *A. rhizogenes* e umidade. Diversos tipos de explantes de amendoim já foram testados para inoculação de *A. rhizogenes*, tais como hipocótilo, eixo embrionário, epicótilo e folhas, e todos eles demonstraram uma eficiência de transformação inferior a 75% (Akasaka et al., 1998; Chu et al., 2014; Liu et al., 2016). A única exceção foi o pecíolo em folhas destacadas com 91% de eficiência de transformação (Liu et al., 2016) que é semelhante a eficiência encontrada no presente trabalho. A menor eficiência (14%) foi obtida utilizando hipocótilos em condições *in vitro*.

O primeiro estudo com transformação de amendoim com linhagens selvagens de *A. rhizogenes* para obtenção de plantas compostas foi realizado por Akasaka e colaboradores (1998), onde observou-se a morfologia das raízes em cabeleira e a formação de nódulos radiculares. Nesse estudo, a eficiência de transformação de epicótilos foi de 62%. Trabalhos mais recentes (Geng et al., 2012) apresentaram eficiência semelhante quando utilizaram eixos embrionários para avaliar a atividade inseticida de um gene sintético (*cry8Ea1*) possivelmente envolvido na resistência a *Holotrichia parallela* em raízes transgênicas de amendoim. Em 2014, a eficiência de transformação foi aumentada para 75% utilizando hipocótilos de amendoim (Chu et al., 2014). Além dos estresses bióticos acima citados, plantas compostas de amendoim também foram utilizadas recentemente, para o estudo das respostas de raízes transgênicas ao estresse abiótico, em particular a seca (Liu et al., 2016). Plantas compostas foram obtidas com alta eficiência de transformação (91%) superexpressando os seguintes genes: *AhAREB1*, um fator de transcrição isolado de amendoim e relacionado com a resistência a seca, e quatro genes responsivos a estresse (os fatores de transcrição *WRKY33* e *MYB92*, um receptor de ácido abscísico *PYL5* e uma desidrina 2 *DHN2*). As culturas *in vitro* de raízes transgênicas

de amendoim também foram exploradas para a produção e secreção de altos níveis de resveratrol, um metabólito com propriedades antioxidantes e anticancerígenas (Medina-Bolivar et al., 2007).

Uma limitação para o sucesso na indução de raízes transgênicas em amendoim é a densidade celular e o estágio de desenvolvimento da linhagem de *Agrobacterium* (Geng et al., 2012; Bansal et al., 2014). A pasta bacteriana utilizada no protocolo aqui desenvolvido combinou uma elevada densidade de células bacterianas com uma cultura de *Agrobacterium* recente (em fase exponencial de crescimento), permitindo uma transformação eficiente (Kereszt et al., 2007; Chu et al., 2014). A pasta utilizada na transformação manteve um crescimento exponencial de *Agrobacterium* mesmo após a inoculação no pecíolo. Sonia et al. (2007) observaram efeitos adversos do crescimento acentuado bacteriano, como a produção de compostos tóxicos que causam necrose no explante, reduzindo a taxa de transformação. A pasta de *A. rhizogenes* é introduzida no tecido vascular dentro do pecíolo por meio de uma agulha, colocando assim a bactéria em contato com as células do tecido vascular que têm a competência de se diferenciar em raízes (procâmbio e parênquima vascular) (Chen et al., 2016). Além disso, este processo de inoculação aumenta a produção de compostos fenólicos na região do ferimento o que atrai as bactérias por quimiotaxia para as células competentes para a diferenciação, aumentando a eficiência de transformação (Chandra, 2012).

Além da linhagem K599 de *A. rhizogenes* aqui utilizada na transformação, muitas outras linhagens selvagens patogênicas (ATCC 15834, A4 e MAFF-02-10266) e engenheiradas (R1000, R1601 e R1200) de *A. rhizogenes* têm sido também utilizadas para induzir raízes em cabeleira em amendoim (Akasaka et al., 1998; Kim et al., 2010; Chu et al., 2014). Entretanto, apenas a linhagem selvagem K599 tem sido utilizada com sucesso em estudo de interação amendoim-nematoide das galhas (Chu et al., 2014), atestando que os nematoides podem completar seu ciclo de vida em raízes transgênicas induzidas por essa linhagem. Uma das principais restrições no uso de raízes em cabeleira para estudos de análise funcional de genes é a sua variabilidade morfológica (crescimento plagiotrópico e rápido, alto grau de ramificação lateral e profusão de pelos radiculares) devido ao desequilíbrio hormonal na raiz promovido pela expressão de oncogenes do T-DNA (Mehrotra et al., 2015). Este fenótipo, conhecido como raiz em cabeleira (ou *hairy root* em inglês), está fortemente associado à linhagem de *A. rhizogenes* utilizada e pode dificultar a análise dos efeitos pleiotrópicos induzidos pela expressão do transgene nas raízes transformadas. Apesar do fenótipo, as raízes em cabeleira se comportam em geral

como órgãos radiculares diferenciados e funcionais e podem ser exploradas para estudos de biologia em raiz (Plovie et al., 2003), como no caso da linhagem K599 utilizada nesse estudo.

Por fim, a câmara montada para manter a alta umidade no interior da placa de Petri pareceu melhorar a eficiência de transformação, uma vez que é necessária uma umidade elevada nos dias que sucedem à inoculação para a correta formação e desenvolvimento de raízes transgênicas (Estrada-Navarrete et al., 2007; Kereszt et al., 2007; Chu et al., 2014). O uso de uma câmara de umidade elevada em placa de Petri só é possível quando são utilizados explantes pequenos, como no caso de folhas destacadas, se tornando inviável para plantas inteiras, como no caso de plantas compostas (Akasaka et al., 1998; Chu et al., 2014). Além disso, a utilização de placas de Petri, cada uma contendo até duas folhas destacadas, reduz consideravelmente o espaço utilizado para o ensaio, permitindo uma análise em larga escala, uma vez que uma única folha pode produzir em média seis raízes transgênicas, cada uma representando um evento de transformação independente. Adicionalmente, sendo uma metodologia *ex vitro*, a metodologia aqui desenvolvida não requer infraestrutura e material de cultura de tecidos, reduzindo muito os custos de sua realização.

6.1.1. Inoculação de *M. arenaria* em raízes transgênicas de amendoim

As raízes transgênicas obtidas após a inoculação do pecíolo de folhas destacadas de amendoim foram testadas para a infecção com o nematoide formador de galhas *M. arenaria*. Os genes *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*, isolados de espécies silvestres de amendoim resistentes a *M. arenaria* (*A. duranensis* e *A. stenosperma*), foram escolhidos como candidatos para serem superexpressos em raízes transgênicas da espécie cultivada (*A. hypogaea*). As raízes transgênicas de amendoim transformadas com o vetor vazio foram infectadas com sucesso por *M. arenaria*, observando-se os sintomas de infecção, como estabelecimento do sítio de alimentação e a produção de massas de ovos no final do seu ciclo de vida, 60 dias após a inoculação. Estes resultados sugerem que as raízes transgênicas desenvolvidas no pecíolo de folhas destacadas de amendoim, após a inoculação com *A. rhizogenes*, constituem um bom modelo para a validação *in planta* de genes candidatos e podem ser utilizadas com sucesso para bioensaios de infecção com nematoides.

Raízes transgênicas de amendoim superexpressando os três genes candidatos (*AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP*) demonstraram uma redução significativa no número de galhas e massas de ovos aos 60 dias após a inoculação. Esses genes podem assim conferir, via transgenia, resistência à infecção por *M. arenaria* na cultura do amendoim, e corroborou com estudos anteriores que mostraram que a superexpressão de *AdEXLB8* em raízes de plantas compostas de soja diminuiu significativamente a infecção por *M. javanica* (Guimaraes et al., 2017). Ao longo dos últimos anos, as raízes transgênicas têm sido amplamente exploradas para estudos relacionados à infecção por nematoides em diversas culturas como, amendoim, soja, café, melão e feijão (Alpizar et al., 2006; Estrada-Navarrete et al., 2007; Pak et al., 2009; Bosselut et al., 2011; Matthews et al., 2013). Devido à simplicidade, eficiência e baixo custo, essas raízes tornaram-se o método de escolha para a análise em larga escala de genes candidatos relacionados com interações entre plantas e microrganismos radiculares (patogênicos ou simbiotes), tais como, nematoides, fungos e bactérias. Em geral, o processo para produção de uma planta transgênica é longo, laborioso e dispendioso, principalmente para plantas recalcitrantes à transformação genética como o amendoim. Além disso, a indução *ex vitro* de raízes transgênicas, como aqui descrita, é mais adequada para estudos de interações planta-nematoide, pois evita etapas críticas de esterilização de nematoides e de manutenção de um complexo sistema axênico composto por três organismos: planta, nematoide e bactéria (Narayanan et al., 1999).

Em resumo, as principais vantagens do uso de raízes em cabeleira obtidas pela metodologia de transformação de pecíolos de folhas destacadas de amendoim, aqui desenvolvida, para validar genes candidatos *in planta* são:

- (i) Economia de espaço, uma vez que todas as etapas são realizadas em placas de Petri e não requerem plantas inteiras;
- (ii) Economia de tempo, uma vez que as raízes em cabeleira podem ser utilizadas para fenotipagem com 20 dias após a inoculação com *A. rhizogenes*;
- (iii) Condições *ex vitro*, que permitem a utilização de microrganismos não esterilizados (patógenos ou simbiotes) para inoculação de raízes;
- (iv) Baixo custo, pois instalações de cultura de tecidos não são necessárias;
- (v) Análise em larga escala, devido ao fato de que uma única folha destacada pode produzir em média seis raízes transgênicas e cada raiz representa um evento de transformação independente; e

- (vi) Alta eficiência de transformação.

6.2. Indução de raízes transgênicas em plantas compostas de soja

A eficiência de transformação de soja foi avaliada de acordo com a quantidade de plantas que apresentaram pelo menos uma raiz transformada (observação da expressão da proteína eGFP em microscópio), em relação a quantidade de plantas transformadas. A eficiência média aqui obtida foi de 69%, semelhante ao trabalho de Kuma et al., (2015), que utilizaram o mesmo genótipo de soja ('Willians 82') no qual a eficiência média de transformação foi de 55%. Tal eficiência é superior a trabalhos anteriores, em que a eficiência média não ultrapassa 34%, utilizando a mesma metodologia de agroinfiltração aqui descrita, porém com outros genótipos, talvez mais recalcitrantes para transformação que 'Willians 82', como 'Jack'; 'KS4704' e 'Bragg' (Li et al., 2010; Lin et al., 2011). Noventa dias após a transformação com *A. rhizogenes*, somente 66,2% das plantas (55 de 83 plantas) que inicialmente continham raízes transformadas ainda apresentaram raízes eGFP positivas. Esse resultado é semelhante ao observado por Alzohairy et al. (2013), no qual foi verificado um rendimento de 65 a 70% de plantas transformadas após aproximadamente 40 dias de transformação. Collier et al. (2005) observaram que, dentre as plantas de soja transformadas (possuindo pelo menos uma raiz transformada), apenas 50% das raízes eram eGFP positivas. Este resultado corrobora com o observado no presente estudo, onde 60% das raízes das plantas que apresentaram o fenótipo de raiz em cabeleira apresentaram fluorescência típica da proteína eGFP. O tempo de obtenção de raízes transformadas prontas para inoculação com *M. incognita* aqui observado (25 dias após a germinação) é menor do que aquele observado em trabalhos anteriores (Ibrahim et al., 2011; Alzohairy et al., 2013), que necessitaram de aproximadamente 40 e 63 dias, respectivamente, para obter plantas com raízes transgênicas prontas para serem inoculadas com nematoides.

Assim como para folhas destacadas de amendoim, a forma de inoculação da pasta de bactéria, paralela ao feixe vascular do hipocótilo de plântulas de soja, pode influenciar consideravelmente a eficiência de transformação. A inoculação da bactéria de forma superficial no tecido vegetal pode resultar em uma baixa eficiência de transformação (Li et al., 2010; Lin et al., 2011). Li et al. (2010) utilizaram o método de transformação de plântulas de soja por infiltração de *A. rhizogenes*, empregando a higromicina nas etapas

de seleção *in vitro* das raízes transformadas por um período de 2 a 4 semanas, para a eliminação e/ou inibição do aparecimento de raízes não-transformadas e seleção apenas das transgênicas. No presente estudo, não houve seleção pelo antibiótico higromicina, pois os eventos transgênicos eram selecionados pela emissão de fluorescência da eGFP, e todas as etapas do protocolo foram realizadas em condições *ex vitro*, tornando o trabalho menos laborioso. Kuma e colaboradores (2015), evidenciaram que a utilização de higromicina como agente seletivo não foi capaz de impedir a formação e/ou eliminar raízes não-transgênicas de forma eficiente após um período de até 10 dias de exposição ao antibiótico. Na presente metodologia, a detecção e eliminação de escapes foram realizadas pela excisão de raízes não-transgênicas, por meio da observação da fluorescência da proteína eGFP. As raízes transformadas eram facilmente identificadas pela fluorescência emitida sob microscópio, enquanto as não-transformadas não apresentaram nenhum sinal. O uso de genes repórteres, como o eGFP, para a triagem *in vivo* de eventos transgênicos é amplamente descrito na literatura (Lacorte e Barros, 2015) e, em particular para identificar raízes transgênicas em plantas compostas de soja (Collier et al., 2005; Li et al. 2010; Ibrahim et al. 2011).

6.2.1. Inoculação de *M. incognita* em plantas compostas de soja

As raízes transgênicas de plantas compostas de soja foram infectadas com sucesso pelo nematoide formador de galha *M. incognita*, com estabelecimento do sítio de alimentação e produção de massas de ovos ao final do seu ciclo de vida. Kuma et al. (2015) também infectaram com sucesso raízes transgênicas de soja com nematoides da espécie *M. javanica*, no estágio de desenvolvimento juvenil 2, e confirmaram a infecção em raízes coletadas oito dias após a inoculação. Estes resultados, juntamente com os aqui apresentados, sugerem que raízes em cabeleira desenvolvidas em plantas compostas de soja constituem um bom modelo para a validação *in planta* de genes candidatos e podem ser utilizadas com sucesso para bioensaios de infecção com nematoides.

As raízes transgênicas de soja superexpressando os genes candidatos *AdEXLB8* e *AsDUF* demonstraram uma redução significativa no número de galhas e massas de ovos de *M. incognita*, assim como observado em raízes transgênicas de amendoim superexpressando os mesmos genes após infecção com *M. arenaria*. Estes resultados indicam que a superexpressão dos genes *AdEXLB8* e *AsDUF* podem conferir resistência à infecção por essas duas espécies e, de um modo mais amplo, aos nematoides formadores

de galha (*Meloidogyne* spp.). Essa hipótese é corroborada por estudos anteriores da nossa equipe que demonstraram que a superexpressão de *AdEXLB8* em raízes de plantas compostas de soja também reduziu significativamente a infecção por uma terceira espécie de *Meloidogyne*, *M. javanica* (Guimaraes et al., 2017).

6.3. Genes candidatos

Ao longo dos últimos anos, raízes em cabeleira obtidas por infecção com linhagens selvagens de *A. rhizogenes* têm sido amplamente exploradas para estudos da interação planta-nematoide em muitas culturas, incluindo a validação *in vivo* de genes candidatos para resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) (Alpizar et al., 2006; Bosselut et al., 2011; Chu et al., 2014; Guimaraes et al., 2017). Os genes candidatos validados no presente estudo, em amendoim e soja, mostraram taxas semelhantes de redução da infecção causada pelos nematoides *M. arenaria* e *M. incognita*, respectivamente. A superexpressão do gene *AdEXLB8* conferiu uma grande redução no número de galhas e massas de ovos em comparação com o controle. Além disso, esse gene mostrou maior redução nos sintomas avaliados quando comparado com os outros dois genes candidatos (*AsDUF* e *AsLIP*). O gene *AdEXLB8* codifica uma Expansina-like B isolada de *A. duranensis*, em relatado anterior a expressão de *EXLB8* foi associada à resistência a nematoides (Guimaraes et al., 2017). Expansinas são proteínas envolvidas na plasticidade da parede celular em resposta a estímulos ambientais como o ataque de fitopatógenos (McQueen-Mason et al., 1992; Marowa et al., 2016) e foi observado um aumento de sua expressão em raízes expostas a diferentes estresses (Guimaraes et al., 2015; Brasileiro et al., 2015). O segundo gene aqui estudado, *AsDUF*, codifica uma proteína que contém domínio conservado DUF (*Domain of Unknown Function*) pertencente a uma família de função desconhecida (Gholizadeh et al., 2011). As plantas, em resposta a diferentes estresses, ativam várias proteínas que provavelmente estão envolvidas em seus mecanismos de defesa. Estas proteínas são encontradas em resposta a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos (Gholizadeh et al., 2011). A superexpressão de *AsDUF* ocasionou uma redução significativa dos sintomas causados pelos nematoides formadores de galhas *M. arenaria* e *M. incognita* em raízes transgênicas, com uma diminuição no número de galhas e de massas de ovos muito semelhante em amendoim e soja, quando comparado com o controle. O terceiro gene candidato aqui estudado, *AsLIP*, foi testado apenas em raízes transgênicas de amendoim

onde sua superexpressão reduziu significativamente o número de galhas e de massas de ovos. Entretanto, apesar de induzir uma redução dos sintomas da doença, o gene *AsLIP* diferiu significativamente dos outros genes candidatos (*AdEXLB8* e *AsDUF*) e, por isso, não foi selecionado para prosseguir na avaliação em raízes transgênicas de soja. Altos níveis de ácido salicílico, que muitas vezes levam à RH, são regulados por proteínas como as Lipocalinas, que estão envolvidas na modulação da tolerância ao estresse oxidativo (Zinovieva et al., 2011). As Lipocalinas de plantas têm demonstrado um importante papel na remoção de moléculas potencialmente nocivas, ROS, conhecidas por serem induzidas por estresses relacionados a temperaturas extremas e excesso de luz (Charron et al., 2008).

A semelhança dos resultados obtidos em amendoim e soja sugere que a superexpressão dos genes candidatos *AdEXLB8* e *AsDUF* em raízes transgênicas dessas leguminosas mantém um padrão na resposta à infecção e ao desenvolvimento da doença causada pelos nematoides formadores de galhas, *M. arenaria* e *M. incognita*. A descoberta de novos genes envolvidos na interação planta-nematoide e, em particular, aqueles que podem estar envolvidos na resistência aos nematoides da galha, é de grande interesse para os programas de melhoramento genético de amendoim e de soja.

Atualmente, existem cultivares de amendoim resistentes a *M. arenaria* como, por exemplo, COAN, Nematán e Tifguard, que foram desenvolvidas pela introgressão de uma região cromossômica da espécie silvestre de amendoim *A. cardenasii* (Holbrook et al., 2003; Tillman., 2010). Em relação à soja, já existem cultivares resistentes a *M. incognita* como, BRS282, BRS256RR, BRS260, desenvolvidas pela Embrapa Soja (Embrapa, 2008). Entretanto, as espécies de nematoides podem desenvolver a habilidade de quebrar a resistência das cultivares, fazendo-se assim necessário prosseguir na busca de novas fontes de resistência às populações de *Meloidogyne* que causam danos expressivos nessas culturas. Portanto, é desejável a identificação de novos genes relacionados à defesa em espécies silvestres de *Arachis* (que também pode ser útil para outras leguminosas), para ampliar as fontes de resistências implantadas no amendoim e também garantir maior durabilidade dessa resistência.

7. CONCLUSÕES

- Uma metodologia inédita, simples, eficiente, rápida, de baixo custo e que requer pouco espaço, foi estabelecida para obtenção de raízes transgênicas a partir de explantes alternativos (folhas destacadas) de amendoim;

- Uma metodologia eficiente para inoculação de nematoides formadores das galhas (*Meloidogyne* spp.) foi estabelecida em raízes em cabeleira desenvolvidas a partir de folhas destacadas de amendoim e em plantas compostas de soja;

- Raízes em cabeleira de amendoim e de soja constituem um bom modelo para a validação *in planta* de genes candidatos e podem ser utilizadas com sucesso para estudos de interação planta-nematoide;

- A superexpressão dos genes *AdEXLB8*, *AsDUF* e *AsLIP* em raízes transgênicas foi capaz de reduzir significativamente a infecção causada por duas espécies de nematoides formadores de galhas (*M. arenaria* e *M. incognita*) em diferentes espécies de leguminosas (amendoim e soja).

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akasaka, Y., Mii, M., Daimon, H., (1998). Morphological Alterations and Root Nodule Formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transgenic Hairy Roots of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Ann Bot*, 81:355–362.

Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A. C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., Etienne, H., (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed root and composite plants for studying gene expression in coffee root. *Plant Cell, Rep* 25:959–967.

Alzohairy, A. M., Macdonald, M. H., Matthews, B. F. (2013). The pjan25 vector series: an enhancement of the Gateway-compatible vector pGWB533 for broader promoter testing applications. *Plasmid*. v. 69. n. 3. p. 249-56.

Bailey, J. (2002). Peanut Disease Management. North Carolina *Peanut Production Guide*. Chapter 6. 19pp.

Bansal, M., Kumar, A., Sudhakara-Reddy. M. (2014). Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and “bacoside A” production from *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Acta Physiol Plant* 36:2793–2801.

Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.*, 65,1229-1240.

Bertioli, D. J., Leal-Bertioli, S. C. M., Carneiro, R. G., Valls, J.F.M., Fávero, A. P., Bruzzi, M., Vello, N. A., Moraes, S. e Guimaraes, P. M. (2000). The Brazilian *Arachis* germplasm bank: its diversity, disease resistances and resistance gene analogues. *Molecurar Genetics os Model Legumes*, p. 24-28.

Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nuc. Acid Res.* 12, 8711–8721.

Boneti, J. I. S., Ferraz, S. (1981). Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, n. 3, 1981.

Bosselut N., Ghelder, C. V., Claverie, M., Voisin, R., Onesto, J. P., Rosso, M. N., Esmenjaud, D. (2011) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in Hairy-root and composite plants. *Plant Cell Rep* 30:1313–1326.

Brasileiro A. C. M., Carneiro V. T. C. (2013). *Manual de transformação genética de plantas*, 2ª Edição edn. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil.

Brasileiro, A.C.M., Morgante, C.V., Araujo, A.C.G., Leal-Bertioli, S.C.M., Silva, A.K., Martins, A.C.Q., Vinson, C.C., Santos, C.M.R., Bonfim, O., Togawa, R.C., Saraiva, M.A.P., Bertioli, D.J., Guimaraes, P.M. (2015). Transcriptome Profiling of Wild *Arachis* from Water-Limited Environments Uncovers Drought Tolerance Candidate Genes. *Plant Mol Biol Rep*, 33: 1876.

Brunings, A. M., Datnoff, L. E., Ma, J. F., Mitani, N., Nagamura, Y., Rathinasabapathi, B., Kirst, M. (2009). Differential gene expression of rice in response to silicon and riceblast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology*, v.155, p.161-170.

Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Klein-Lankhorst, R.M., Salentijn, E.M., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, U., Grundler, F.M., Jung, C. (1997). Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832-834.

Chandra, S., (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes* : role of T- DNA in plant secondary metabolism. 407–415.

Charchar, J.M., Boiteux, L.S., Giordano, L.B. (2004). Epidemics of *Meloidogyne brasilienses* on processing tomato hybrids carrying the *Mi* (root-knot nematode resistance) gene in Central Brazil. *Summa Phytopathologica*, v. 30, p. 108.

Charron, J-B. F., Ouellet, F., Houde, M., Sarhan, F. (2008). The plant apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biology* 8(1), 86.

Chen, X., Cheng, J., Chen, L., Zhang, G., Huang, H., Zhang, Y., Xu, L. (2016). Auxin-Independent NAC pathway acts in response to explant-specific wounding and promotes root tip emergence during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 170:2136–45.

Chu, Y., Guimaraes, L. A., Wu, C. L., Timper, P., Holbrook, C. C., Ozias-Akins, P. (2014). A technique to study *Meloidogyne arenaria* resistance in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed peanut. *Plant Dis.* 98:1292-1299.

Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Kevin, W. L., Taylor, C.G. (2005). Ex vitro composite plantas: na inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* v. 43, n. 3, p. 449-57.

CONAB. (2004). Conjuntura Semanal. Especiais 16-20/09. *Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento – Conab*, 2004.

CONAB. (2006). Conjuntura Semanal. Especiais 24-28/06. *Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento – Conab*, 2006.

Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 25 pp. 162-172.

Deng, Y., Mao, G., Stutz, W., Yu, O. (2011). Generation of composite plants in *Medicago truncatula* used for nodulation assays. *J. Visual Exp.* 49:2633.

Eisenback, J. D., Bernard, E. C., Starr, J. L., Lee, T. A., Tomaszewski, E. K. (2003). *Meloidogyne haplanaria* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peanut in Texas. *Journal of Nematology* 35:395-403.

Embrapa, (2008). Agência Embrapa de informação tecnológica (ageitec), nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.). Acesso em Janeiro de 2017, disponível em <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000gcglrznk02wx5ok0rofsmq1qran1w.html>

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana O, Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M., Sánchez F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: A tool for functional genomics. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19 1385–1393.

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., Sánchez, F. (2007). Fast, eficiente

and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc* 2:1819–1824.

Evangelista, A. R., Lopes, J., Abreu, J. G., Neto, P. C. e Fraga, A. C. (2004). Composição química de tortas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e mamona (*Ricinus communis* L.) – extração de óleo a frio. 1º Congresso de Plantas Oleaginosas, Óleos Vegetais e Biodiesel. Varginha – MG, Brasil.

Fávero, A. P. (2004). Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado. Tese de doutorado. ESALQ, Piracicaba.

Geng, L., Niu, L., Gresshoff, P.M., Shu, C., Song, F., Huang, D., Zhang, J. (2012). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 109:491-500.

Gheysen, G., Fenoll, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 191- 219.

Gholizadeh, A. (2011). Heterologous Expression of Stress-Responsive DUF538 Domain Containing Protein and its Morpho-Biochemical Consequences. *The Protein Journal*, v. 30 pp 351-358.

Gregory, W. C., Krapovickas, A., Gregory, M. P. (1980). Structure, variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: Summerfield, R.J.; Bunting, A.H. (Ed.) *Advances in Legume Science*. Kew, Royal Botanical Gardens, p.469-481.

Guimaraes P. M., Brasileiro A. C. M., Proite K., de Araújo A., Leal-Bertioli S., Pic-Taylor A., Silva, F. R., Morgante, C. V., Ribeiro, S. G., Bertioli, D. J. (2010). A Study of Gene Expression in the Nematode Resistant Wild Peanut Relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biol.* 3(4):183–92.

Guimaraes, P. M., Guimaraes, L. A., Morgante, C. V., Silva Jr, O. B., Araujo, A. C. G., Martins, A. C. Q., Saraiva M. A. P., Oliveira, T. N., Togawa, R. C., Leal-Bertioli, S. C.

M., Bertioli, D. J., Brasileiro, A. C. M. (2015). Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. *PLoS ONE*, 10 (10), p.22.

Guimaraes, L. A., Mota, P. A. Z., Araujo, A. G. C., Figueiredo, L. F. A., Pereira, B. M., Saraiva, M. A. P., Silva, R. B., Danchin, E. G. J., Guimaraes, P. M., Brasileiro, A. C. M. (2017). Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. *Plant Molecular Biology*.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25: 989-994.

Han, Y., Chen, Y., Yin, S., Zhang, M., Wang, W. (2015). Over-expression of TaEXPB23, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *J. Plant Physiol.*, 173,62-71.

Hildebrand, E.M. (1934). Life History of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nurse apple trees. *Journal of agricultural research* 48: 857-885 p. 857-885.

Holbrook, C., Stalker, H. (2003). Peanut breeding and genetic resources. *Plant Breeding Reviews.*, 22:297-355.

Huang, C. S., Charchar, J. M. (1981). Período de permanência de *Crotalaria spectabilis* no campo influenciando no controle de meloidoginose em cenoura. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.6, suplemento, p.538-539.

Huang, C. S., Mota e Silva, E. F. S. (1980). Interrupção do ciclo vital de *Meloidogyne incognita* por *Crotalaria* spp. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.5, suplemento, p.402-403.

Hilu, K. W., Stalker, H. T. (1995). Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* (Fabaceae): Evidence from RAPDs. *Plant Systematics and Evolution*, v. 198, pp 167-178.

Ibrahim, H., Hosseini, P., Alkharouf., Hussein, E., Gamal El-Din, A.E.K., Aly, M., Matthews, B. (2011). Analysis of Gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC Genomics* 12:220.

- Jung, S., Tate, P. L., Horn, R., Kochert, G., Moore, K. e Abbot, A. G. (2003). The Phylogenetic Relationship of Possible Progenitors of the Cultivated Peanut. *Journal of Heredity* 94(4): 334-340.
- Kuma, K.M., Lopes-Caitar, V.S., Romero, C.C.T., Silva, S.M.H., Kuwahara, M.K., Carvalho, M.C.C.G., Abdelnoor, R.V., Dias, W.P., Marcelino-Guimaraes, F.C. (2015). A high efficient protocol for soybean root transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and most stable reference genes for RT-qPCR analysis. *Plant Cell Rep.*, 34, 1987-2000.
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C. D., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., Gresshoff, P. M. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat Protoc.* 2:948–952.
- Kim, J., Lee, S., Park, S. (2010). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African J Biotechnol* 7:3788–3790.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C. R. e Moore, K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 83: 11282-11291.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D. (2008). Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 9823-9828.
- Krapovickas, A., Gregory, W. C. (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, v.8, p .1-186.
- Lacorte, C., Barros, L. M. G.(2015). Genes repórteres gus (beta-glucuronidase) e gfp (proteína verde-fluorescente). In: Brasileiro, A. C. M., Carneiro, V. T. C. (Org.). *Manual de Transformação Genética de Plantas*. 2ed. Brasília: Embrapa, p. 147-164. 2015.
- Lavia, G., Fernández, A., Simpson C., Seijo, G. (2001). Cytogenetic analysis in wild diploid *Arachis* species (Leguminosae). *Cytologia* 66: 293-298.
- Leal-Bertioli, S. C. M., Guimaraes, P. M., Bruzzi, M., Carneiro, R. G., Valls, J. F.M., Bertioli. D. J. (1999). Busca de resistência ao nematoide das galhas *Meloidogyne* spp. e

sequências análogas a genes de resistência em acessos silvestres de *Arachis*. *Boletim de Pesquisa-série EMBRAPA*. Nº 20.

Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Hervé, C., Tóth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A., Ott, T. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2343-2348.

Li, J., Todd, T. C., Trick, H. N. (2010). Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. *Plant Cell Rep* 29:113–123.

Lin, M-H., Gresshoff, P. M., Indrasumunar, A., Ferguson, B. J. (2011). pHairyRed: A novel binary vector containing the *DsRed2* reporter gene for visual selection of transgenic hairy roots. *Molecular plant*, v. 4, n. 3, p.

Liu, S., Su, L., Liu, S., Zeng, X., Zheng, D., Hong, L., Li, L. (2016). *Agrobacterium rhizogenes* -mediated transformation of *Arachis hypogaea*: an efficient tool for functional study of genes. *Biotechnol Equip* 2818:1–10.

Matthews, B.F., Beard, H., MacDonald, M.H., Kabir, S., Youssef, R.M., Hosseini, P., Brewer, E. (2013). Engineered resistance and hypersusceptibility through functional metabolic studies of 100 genes in soybean to its major pathogen, the soybean cyst nematode. *Planta* 237:1337–1357.

Marowa, P., Ding, A., Kong, Y. (2016). Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep.*, 1-17.

McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4, 1425-1433.

Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A.M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S.F., Bennett, S., Dolan, M.C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68:1992–2003.

Mehrotra, S., Srivastava, V., Rahman, LU., Kukreja, a. K. (2015). Hairy root biotechnology - indicative timeline to understand missing links and future outlook. *Protoplasma* 252:1189–1201.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor 466 pp.

Mitreva, M., Blaxter, L. M. R., Bird, D. M., Carter, J. P. (2005). Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics* 21(10):573-581.

Moraes, S.A., Salgado, C.L. (1982). Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Bert. e Curt.) Ell. e Ev. *Summa Phytopathologica*, v.8, p.39-55.

Morgante, C. V., Brasileiro, A. C. M., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C. G., Fonseca, L. N., Leal-Bertioli S., Bertioli, D. J., Guimaraes, P. M. (2013). A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biology*. 40 (12): 1298-309.

Narayanan, R. A., Atz, R., Denny, R., Young, N. D., Somers, D. A. (1999). Expression of Soybean Cyst Nematode Resistance in Transgenic Hairy Roots of Soybean Contribution no. 991130114 from the Minnesota Agric. Exp. Stn. This work was supported in part by USDA/95-37300- 1593. *Crop Sci*, 39:1680–1686.

Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., Lobe, C.G. (2000). Z/EG, a double reporter mouse 51 line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28: 147–155.

Pak, H.K., Sim, J.S., Rhee, Y., Ko, H.R., Ha, S.H., Yoon, M.S., Kang, C.H., Lee, S., Kim, Y.H., Hahn, B.S. (2009). Hairy root induction in Oriental melon (*Cucumis melo*) by *Agrobacterium rhizogenes* and reproduction of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:219–228.

Plovie, E., De Buck, S., Goeleven, E., Tanghe, M., Vercauteren, I., Gheysen, G. (2003). Hairy roots to test for transgenic nematode resistance: *Think twice*. *Nematology* 5:831–841.

Proite, K., Leal-Bertioli, S., Bertioli, D., Moretzsohn, M., Silva, F., Martins, N., Guimaraes, P. (2007). ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biol.* 7:7.

Proite, K., Carneiro, R., Falcão, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimaraes, P., Bertioli, D. (2008). Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57 (5):974–80.

Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery Apple trees. *Journal of Agricultural Research*, v. 41 No. 7 pp. 507-540pp.

Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D. e Moscone, E. A. (2004). Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 91: 1294-1303.

Semblat, J. P., Bongiovanni, M., Wajnberg, E., Dalmaso, A., Abad, P., Castagnone-Sereno, P. (2000). Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity*. 84: 81-89.

Simpson, R.B., Spielmann, A., Margossian, L., McKnight, T.D.(1986). A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*: frequent co-transformation of two distinct T-DNAs. *Plant Mol. Biol.* 6, 403–415.

Sonia., Saini, R., Singh, R.P., Jaiwal, P. K. (2007). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor-1 gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using *bar* as selectable marker. *Plant Cell Rep* 26:187–198.

Taylor, A. L., Sasser, J. N. (1978). Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). NCSU and USAID Cooperative Publication, Raleigh, NC, U.S.A.

Tillman, B., Stalker, H. T. (2010) Peanut. In: VollmannJ, RajcanI, editors. Oil Crops: Springer New York; 2010. p. 287–315.

Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315: 104-107.

Trudgill, D. L., Blok, V. C. (2001). Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 53-77.

Tzortzakakis, E. A., Gowen, S. R., Goumas, D. E. (1996) Decreased ability of *Pasteuria penetrans* spores to attach to successive generations of *Meloidigyne javanica*. *Fund Appl Nematol* 19:201-204.

USDA-FAS. 2015. *Table 01: Major Oilseeds: World Supply and Distribution (Commodity View)*. Acesso em Dezembro de 2016, disponível em USDA – United States Department of Agriculture/FAS – Foreign Agricultural Service: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>

Valls, J. F. M., Simpson, C. E., (1994). Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis*. In: Kerridge, P.C.; Hardy, B. (EDs.). *Biology and Agronomy of Forage Arachis*. Cali: CIAT, p.1-18.

Valls, J. F. M., Simpson C. E. (2005) New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia* 14:35-64.

Vargas Gil, S., Haro, R., Oddino, C., Kearney, M., Zuza, M., Marinelli, A., March, G.J. (2008). Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi. *Crop Protection* 27: 1-9.

Yang, H., Nairn, J., and Ozias-Akins, P. (2003). Transformation of peanut using a modified bacterial mercuric ion reductase gene driven by an actin promoter from *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 160:945-952.

White, L. O. (1972). The taxonomy of the srow gall organismo *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to Rhizobia and to other *Agrobacterium*. *J. Gen Microbiol* 77:565-574.

Williamson, V. M., Gleason, C. A. (2003). Plant-nematode interactions. Current Opinion in *Plant Biology* 6:327-33.

Williamson, V. M., Hussey, H. R. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 8: 1735 – 1745.

Wynne, J. C., Beute, M. K., Nigam, S. N. (1991). Breeding for disease resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Annual Review of Phytopathology* 29:279-303.

Zinovieva, S. V., Vasyukova, N. I., Udalova, Z. V., Gerasimova, N. G., Ozeretskoykaya, O. L. (2011). Involvement of salicylic acid in induction of nematode resistance in plants. *Biol Bull Russ Acad Sci.*, 38(5):453–8.

ANEXOS

Tabela 1 - Avaliação dos números de galhas e massas de ovos por grama de raiz transgênica em folha destacada de amendoim, 90 dias após a inoculação com *M. arenaria*.

Evento transgênico (raiz)*	Peso (g)	Número total de galhas	Número total de massas de ovos	Número de galhas/g	Número de massas de ovos/peso (g)
pPZP-1	0,06	1	1	16,67	16,67
pPZP-2	0,18	4	3	22,22	16,67
pPZP-3	0,21	2	2	9,52	9,52
pPZP-4	0,22	4	3	18,18	13,64
pPZP-5	0,30	8	4	26,67	13,33
pPZP-6	0,25	5	2	20,00	8,00
pPZP-7	0,30	6	3	20,00	10,00
pPZP-8	0,21	5	3	23,81	14,29
pPZP-9	0,34	4	4	11,76	11,76
pPZP-10	0,28	6	5	21,43	17,86
Média	0,24	4,50	3,00	19,03	13,17
pPZP-AdEXLB8-1	0,24	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-2	0,16	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-3	0,13	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-4	0,21	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-5	0,28	1	0	3,57	0
pPZP-AdEXLB8-6	0,08	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-7	0,36	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-8	0,39	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-9	0,24	0	0	0	0
pPZP-AdEXLB8-10	0,34	1	1	2,94	2,94
pPZP-AdEXLB8-11	0,24	0	0	0	0

pPZP- <i>AdEXLB8</i> -12	0,34	0	0	0	0
pPZP- <i>AdEXLB8</i> -13	0,17	0	0	0	0
pPZP- <i>AdEXLB8</i> -14	0,12	0	0	0	0
Médias	0,24	0,14	0,07	0,47	0,21
pPZP- <i>AsDUF</i> -1	0,20	1	1	5,00	5,00
pPZP- <i>AsDUF</i> -2	0,35	2	1	5,71	2,86
pPZP- <i>AsDUF</i> -3	0,15	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AsDUF</i> -4	0,30	1	1	3,33	3,33
pPZP- <i>AsDUF</i> -5	0,33	1	1	3,03	3,03
pPZP- <i>AsDUF</i> -6	0,20	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AsDUF</i> -7	0,13	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AsDUF</i> -8	0,45	2	2	4,44	4,44
pPZP- <i>AsDUF</i> -9	0,35	1	1	2,86	2,86
pPZP- <i>AsDUF</i> -10	0,30	0	0	0,00	0,00
Médias	0,28	0,80	0,70	2,44	2,15
pPZP- <i>AsLIP</i> -1	0,34	3	2	8,82	5,88
pPZP- <i>AsLIP</i> -2	0,38	3	2	7,89	5,26
pPZP- <i>AsLIP</i> -3	0,27	2	1	7,41	3,70
pPZP- <i>AsLIP</i> -4	0,25	1	1	4,00	4,00
pPZP- <i>AsLIP</i> -5	0,28	3	2	10,71	7,14
pPZP- <i>AsLIP</i> -6	0,20	2	1	10,00	5,00
pPZP- <i>AsLIP</i> -8	0,30	3	2	10,00	6,67
pPZP- <i>AsLIP</i> -9	0,31	2	2	6,45	6,45
pPZP- <i>AsLIP</i> -10	0,32	2	3	6,25	9,38
pPZP- <i>AsLIP</i> -11	0,22	2	2	9,09	9,09
pPZP- <i>AsLIP</i> -12	0,14	1	1	7,14	7,14
Médias	0,27	2,17	1,67	8,04	6,17

*Nesse estudo, o conjunto de raízes emitidas a partir sítio de inoculação foi analisado como um evento transgênico.

Tabela 2 - Avaliação dos números de galhas e massas de ovos por grama de raiz transgênica em plantas compostas de soja, 90 dias após a inoculação com *M. incognita*.

Evento transgênico (raiz)*	Peso (g)	Número total de galhas	Número total de massas de ovos	Número de galhas/g	Número de massas de ovos/peso (g)
pPZP-1	1,25	35	30	28,00	24,00
pPZP-2	3,78	61	55	16,14	14,55
pPZP-3	3,05	49	41	16,07	13,44
pPZP-4	3,30	45	44	13,64	13,33
pPZP-5	2,08	72	65	34,62	31,25
pPZP-6	2,85	35	31	12,28	10,88
pPZP-7	1,89	25	23	13,23	12,17
pPZP-8	3,39	35	34	10,32	10,03
pPZP-9	1,25	29	27	23,20	21,60
pPZP-10	4,48	61	60	13,62	13,39
pPZP-11	3,62	49	47	13,54	12,98
pPZP-12	4,23	58	59	13,71	13,95
pPZP-13	2,25	36	38	16,00	16,89
pPZP-14	4,51	57	57	12,64	12,64
pPZP-15	3,81	52	53	13,65	13,91
pPZP-16	2,12	33	34	15,57	16,04
pPZP-17	3,31	46	47	13,90	14,20
pPZP-18	3,23	41	41	12,69	12,69
pPZP-19	2,25	31	32	13,78	14,22
pPZP-20	1,25	35	30	28,00	24,00
Média	2,98	44,74	43,05	16,09	15,42
pPZP-AdEXLB8-1	6,01	5	5	0,83	0,83
pPZP-AdEXLB8-2	5,19	4	4	0,77	0,77
pPZP-AdEXLB8-3	4,22	3	3	0,71	0,71

pPZP- <i>AdEXLB8-4</i>	4,43	4	3	0,90	0,68
pPZP- <i>AdEXLB8-5</i>	3,06	2	2	0,65	0,65
pPZP- <i>AdEXLB8-6</i>	5,08	4	4	0,79	0,79
pPZP- <i>AdEXLB8-7</i>	2,44	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AdEXLB8-8</i>	2,83	2	2	0,71	0,71
pPZP- <i>AdEXLB8-9</i>	3,73	2	2	0,54	0,54
pPZP- <i>AdEXLB8-10</i>	4,51	4	3	0,89	0,67
pPZP- <i>AdEXLB8-11</i>	3,62	3	3	0,83	0,83
pPZP- <i>AdEXLB8-12</i>	3,31	3	2	0,91	0,60
pPZP- <i>AdEXLB8-13</i>	4,96	4	5	0,81	1,01
pPZP- <i>AdEXLB8-14</i>	2,09	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AdEXLB8-15</i>	3,39	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AdEXLB8-16</i>	2,24	3	4	1,34	1,79
pPZP- <i>AdEXLB8-17</i>	2,34	2	2	0,85	0,85
pPZP- <i>AdEXLB8-18</i>	4,19	2	3	0,48	0,72
pPZP- <i>AdEXLB8-19</i>	2,09	1	1	0,48	0,48
pPZP- <i>AdEXLB8-20</i>	3,16	2	2	0,63	0,63
pPZP- <i>AdEXLB8-21</i>	2,74	3	2	1,09	0,73
Médias	3,60	3	2	0,68	0,67
pPZP- <i>AsDUF-1</i>	5,19	13	13	2,50	2,50
pPZP- <i>AsDUF-2</i>	5,15	12	12	2,33	2,33
pPZP- <i>AsDUF-3</i>	5,76	14	13	2,43	2,26
pPZP- <i>AsDUF-4</i>	4,82	12	12	2,49	2,49
pPZP- <i>AsDUF-5</i>	3,89	10	10	2,57	2,57
pPZP- <i>AsDUF-6</i>	2,15	7	7	3,26	3,26
pPZP- <i>AsDUF-7</i>	3,41	12	11	3,52	3,23
pPZP- <i>AsDUF-8</i>	5,65	10	10	1,77	1,77
pPZP- <i>AsDUF-9</i>	0,89	0	0	0,00	0,00
pPZP- <i>AsDUF-10</i>	3,15	9	9	2,86	3,49
pPZP- <i>AsDUF-11</i>	1,64	3	4	1,83	2,44

pPZP- <i>AsDUF</i> -12	3,86	8	10	2,07	2,59
pPZP- <i>AsDUF</i> -13	2,68	9	9	3,36	3,36
pPZP- <i>AsDUF</i> -14	3,02	5	6	1,66	1,99
pPZP- <i>AsDUF</i> -15	3,16	10	11	3,16	3,48
Médias	3,62	9	9	2,38	2,52

*Nesse estudo, o conjunto de raízes emitidas a partir sítio de inoculação foi analisado como um evento transgênico.