

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

**ISOLAMENTO DE GENES E CONSTRUÇÃO DE
VETORES PARA O USO NO SILENCIAMENTO
GÊNICO DE *Meloidogyne incognita***

Isabela Tristan Lourenço

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andréa Queiroz Maranhão
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fátima Grossi de Sá

**Brasília - DF
Outubro de 2008**

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

**ISOLAMENTO DE GENES E CONSTRUÇÃO DE
VETORES PARA O USO NO SILENCIAMENTO
GÊNICO DE *Meloidogyne incognita***

Isabela Tristan Lourenço

Dissertação apresentada para o
Departamento de Biologia Celular
do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Biologia
Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andréa Queiroz Maranhão
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fátima Grossi de Sá

**Brasília - DF
Outubro de 2008**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília – UnB

Dr. Thales Lima Rocha

Embrapa – Recursos Genético e Biotecnologia

Dra. Ângela Mehta dos Reis (Suplente)

Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Andréa Queiroz Maranhão (Orientadora)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília – UnB

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Co-orientadora)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedico esse trabalho aos meus pais, Ricardo e Marlene

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Aos meus pais, Ricardo e Marlene, pela educação, carinho, amor, dedicação, reconhecimento. Vocês são maravilhosos, exemplo de vida!

Ao meu irmão Kico, que mesmo estando tão longe é muito presente, obrigada por ser o responsável por me apresentar ao mundo “molecular”; à minha irmã Marisa, minha “mãezinha”, pelo carinho e preocupação sempre demonstrados.

Aos meus “cunhas” Débora, Marcelo e Roberto, pelos momentos de risada sejam no oito maluco, poker ou na “night”!

Aos meus sobrinhos fofos e amados Ana Carolina, Anna Julia, Guido e Marina.

À toda minha família de Sampa, em especial à minha querida Vó Yaya, que mesmo longe sempre acompanhou meus passos.

Ao meu amor, Rod, que além de meu querido marido é companheiro, carinhoso e...professor, orientador!! Obrigada por todos os ensinamentos, pelos momentos de alegria que vivemos tão intensamente!

À Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, pela excelente oportunidade de trabalhar no LIMPP, pelo exemplo de liderança, dedicação ao trabalho e pela confiança no meu trabalho.

À Lecir, por todas as vezes que atolei ela de pedidos e ela gentilmente e com muita paciência atendeu a todos.

Aos amigos “Biológicos” da UnB, Cherolyne, Aline, Arakawa, Léo, Vini, Nat, Felipão, Paulo, Gui, Sol, Hugo! Galera muito louca!!!! Alegria na certa!

Aos meus queridos e amados amigos Lulu tamanquinho, Firmis e Poly pelos momentos de alegria, conversas, conselhos...vocês são demais!!!!

À dupla dinâmica, Racréu e Dudu, pelas boas risadas, vocês me fizeram “esquecer” que tinha uma dissertação para defender em um curto espaço de tempo...incrível!

À todos os amigos do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga.

À Ana Hilda e ao professor Renato Resende, pelo esforço que fizeram para que essa a conversão para o doutorado fosse possível.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular pelo apoio financeiro dado por meio de bolsa do CNPq.

Por fim, agradeço a Deus.

SUMÁRIO

1.Introdução

1.1.Fitonematóides endoparasitas sedentários.....	1
1.2.Interferência mediada por RNA.....	4
1.3.Plantas geneticamente modificadas usando RNAi.....	6
1.4.Isocitrato Liase.....	9
1.5.Arginina Quinase.....	10
1.6.Proteína 14-3-3.....	12
1.7.Proteína de choque térmico 90.....	12

2.Objetivos.....	14
------------------	----

3.Metodologia

3.1.Cultura de nematoídes.....	15
3.2.Extração de ovos.....	15
3.3.Extração de J2.....	15
3.4.Extração de fêmeas.....	16
3.5.Extração de RNA total.....	16
3.6.Reação de transcrição reversa.....	17
3.7.RT-PCR.....	17
3.8.Amplificação dos fragmentos gênicos da biblioteca de cDNA de J2.....	18
3.9.Clonagem e extração de DNA plasmidial.....	18
3.10.Seqüenciamento e análise das seqüências.....	19
3.11.Subclonagem em vetor de RNAi.....	19
3.12.Células eletrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
3.13.Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i>	22
3.14.Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	23

4.Resultados e Discussão

4.1.Seleção dos genes-alvo.....	25
4.2.Análise das seqüências e desenho dos oligonucleotídeos.....	25
4.3.Amplificação e seqüenciamento dos fragmentos gênicos selecionados.....	26
4.4.Verificação da presença das cópias senso e antisenso dos genes no vetor pK7GWIWG2(I).....	34
4.5.Análise do padrão de expressão gênica por PCR em tempo real.....	34

4.5. Transformação de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	42
5. Conclusão e Perspectivas	44
6. Referências Bibliográficas	45

Anexos

Seqüência dos primers utilizados

Desenho esquemático dos vetores para RNAi

Artigo aceito para publicação

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do nematóide <i>Meloidogyne incognita</i>	3
Figura 2. Via de geração de siRNAs.....	5
Figura 3. Mecanismo de RNAi em <i>M.incognita</i>	8
Figura 4. Juvenil 2 de <i>Meloidogyne incognita</i>	9
Figura 5. Integração entre o ciclo do glioxilato e o ciclo de krebs	11
Figura 6. Representação esquemática do modelo funcional da proteína 14-3-3 em resposta a estresse térmico	13
Figura 7. Desenho esquemático do plasmídeo de entrada pDONR221.....	20
Figura 8. Representação esquemática para clonagem de genes utilizando a metologia Gateway.....	21
Figura 9. Desenho esquemático do plasmídeo para RNAi pk7GWIWG2(I).....	22
Figura 10. Amplificação do fragmento gênico da β -actina.....	28
Figura 11. Amplificação do fragmento gênico de Isocitrato Liase.....	29
Figura 12. Amplificação do fragmento gênico de Arginina Quinase.....	30
Figura 13. Amplificação do fragmento gênico de 14-3-3.....	31
Figura 14. Amplificação do fragmento gênico de HSP90.....	32
Figura 15. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7IL.....	35
Figura 16. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7AQ.....	36
Figura 17. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK714-3-3.....	37
Figura 18. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7HSP90.....	38
Figura 19. Curvas-padrão de amplificação para cálculo de eficiência.....	39
Figura 20. Curvas de monitoramento da eficiência que ilustram a amplificação em tempo real.....	40
Figura 21. Gráfico em barras da expressão diferencial de genes.....	41
Figura 22. Explantes de <i>Nicotiana tabacum</i> em placas para cultura de tecidos.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comparações dos genes-alvo com o GenBank™	33
Tabela 2. Composição dos meios para os três controles experimentais de transformação de tabaco.....	42

LISTA DE TERMOS E ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BAP	6-benzilaminopurina
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
dsRNA	RNA fita dupla
EST	etiqueta de seqüência expressa
g	grama
GFP	proteína fluorescente verde
GM	geneticamente modificado
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilo base
KV	quilo volts
L	litro
M	molar
mA	miliampéres
min	minutos
mg	miligramas
mL	mililitros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ms	milisegundos
m/v	massa/volume
NaCl	cloreto de sódio
NFC	nematóide formador de cisto
NFG	nematóide formador de galha
ng	nanograma
nm	nanômetros
OD ₆₀₀	densidade óptica a 600nm
pb	pares de base
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA interferente
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
siRNA	pequeno RNA interferente
U	unidade
v	volume
V	volts
v/v	volume/volume
<i>x g</i>	força gravitacional
°C	graus Celsius
μ F	microFaraday
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ m	micrômetro

RESUMO

Fitonematóides são responsáveis por grandes perdas econômicas na agricultura mundial estimadas em US\$ 125 bilhões anuais. Esses fitopatógenos têm seu ciclo de vida dividido em seis estádios de desenvolvimento (ovo, juvenil 1-4 e adulto), durando em torno de 28 dias. O juvenil 2 penetra na raiz de planta hospedeira por força mecânica e degradação enzimática para estabelecer a interação planta-patógeno e se diferenciar em fêmea adulta apomítica, depositando em torno de 2000 ovos. Práticas agronômicas têm tido geralmente pouco sucesso e alto custo, sendo o cultivo de variedades resistentes, quando existentes, a forma mais eficiente de controle. Uma estratégia alternativa promissora é a transformação genética de plantas para expressão de moléculas que afetem o parasitismo. A metodologia de RNA interferente tem revolucionado a pesquisa experimental e muitas aplicações biotecnológicas estão sendo desenvolvidas. A abordagem planejada é a transformação genética de *Nicotiana tabacum* com construções plasmidiais para expressão de RNA dupla fita, tendo como propósito o silenciamento dos genes-alvo Isocitrato Liase, Arginina Quinase, Proteína 14-3-3 e Proteína de choque térmico 90 de *Meloidogyne incognita*. Desses genes-alvo, quatro fragmentos gênicos foram selecionados, isolados, subclonados em vetor para RNAi e estão em fase de transformação de planta, para futura realização de bioensaios avaliação de resistência a fitonematóides. Adicionalmente, foi realizada uma análise da expressão dos quatro genes-alvo, normalizados com os genes constitutivos de β -actina e 18S rRNA, por PCR quantitativo em tempo real. Observou-se que alguns genes-alvo são diferencialmente expressos quando comparados as fases de ovo, juvenil 2 e fêmea. A maior diferença de expressão foi do gene codificador de Isocitrato Liase, que é 100 vezes mais expresso em ovo e fêmeas, comparado com J2.

Palavras-chave: fitonematóide, *Meloidogyne*, RNA interferente, silenciamento gênico, *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes are responsible for huge economic losses in world agriculture that reaches US\$ 125 billion yearly. The most important of these phytopatogens, *Meloidogyne incognita*, has six developmental stages during the life cycle (egg, four juveniles and female). The juvenile 2 enters the host root via mechanical force and enzymatic degradation to establish the host-pathogen interaction and differentiate in apomitic adult female, which deposits 2000 eggs. Current agronomic practices have usually been unsuccessful and expensive, so the cultivation of resistant varieties is actually the most efficient way to control nematodes. In this work, it was chosen to transform *Nicotiana tabacum* using plasmidial constructions for double strand RNA expression, aiming silencing target genes Isocitrate Lyase, Arginine Kinase, 14-3-3 Protein and Heat Shock Protein 90 of *Meloidogyne incognita*. Four regions of target genes were selected, isolated, subcloned in RNAi vector and are being used for plant transformation. In addition, it was done an expression analysis of the four target genes, normalized with housekeeping genes β -actin e 18S rRNA, using quantitative real time PCR. This experiment showed that these genes are differentially expressed when compared during egg, J2 and female phases. The major expression difference observed was the Isocitrate Lyase gene, which is a hundred times more expressed in egg or female when compared with J2.

Keywords: phytonematodes, *Meloidogyne*, RNA interference, gene silencing *Nicotiana tabacum*

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Fitonematóides endoparasitas sedentários

Os nematóides são seres muito abundantes e diversificados, podendo representar 80% dos indivíduos do reino Animalia (PLATT, 1999), com estimativas de cem mil a um milhão de espécies (DE LEY e BLAXTER, 2002). Os nematóides parasitas de plantas são distribuídos mundialmente e geram danos econômicos de grandes proporções para a agricultura (ATKINSON *et al.*, 2003). Em 1987, o prejuízo estimado causado por esses fitonematóides foi de 70 bilhões de dólares (SASSER e FRECKMAN, 1987), em 2003 esse prejuízo chegou a cerca de 125 bilhões de dólares (CHITWOOD, 2003).

Os fitonematóides endoparasitas sedentários mais danosos são agrupados em três gêneros: *Meloidogyne*, também chamados de nematóides formadores de galhas (NFG), *Heterodera* e *Globodera*, chamados de nematóides formadores de cisto (NFC) (SASSER, 1980). Dentre os NFG, a espécie *Meloidogyne incognita*, devido a sua distribuição mundial (SASSER *et al.*, 1983; TRUDGILL, 1995), reprodução apomítica e vasta gama de plantas hospedeiras (EHWAETI *et al.*, 1999; JEPSON, 1987), é provavelmente o patógeno mais importante de plantas cultivadas (TRUDGILL e BLOK, 2001).

O ciclo de vida desses nematóides consiste de seis estádios fenológicos: ovo, quatro juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adulto (**Fig. 1**). Depois de penetrar na raiz da planta hospedeira, o juvenil de segundo estágio (J2), usando força mecânica do estilete e degradação enzimática da parede celular e lamela média, modifica células vegetais, que são re-diferenciadas em sítios de alimentação chamados de células gigantes em NFG e sincício em NFC (GHEYSEN e FENOLL, 2002; VAN DER EYCKEN *et al.*, 1996). Após sucessivas ecdises, o juvenil J2 se diferencia em J3 e J4, assumindo uma forma salsichóide. Quando em condições desfavoráveis de parasitismo, o J4 se diferencia em macho adulto, vermiforme e abandona a raiz. Por outro lado, quando a interação molecular planta-nematóide é favorável, ocorre a diferenciação do J4 em fêmea adulta, com formato de pêra, que completa seu ciclo de vida, geralmente em menos de um mês, depositando em torno de 2.000 ovos (WILLIAMSON e GLEASON, 2003).

O desenvolvimento e a reprodução dos nematóides dependem do estabelecimento de sítios de alimentação especializados na raiz da planta hospedeira e, por esse motivo, os nematóides não matam as células das quais se alimentam (ABAD *et al.*, 2003). Para estabelecer essa relação de parasitismo, eles induzem a rediferenciação celular, que leva à formação de células multinucleadas denominadas sincício em NFC e células gigantes em NFG. A formação da célula gigante é resultado de múltiplas divisões nucleares sem citocinese. Concomitante ao surgimento dessas células, ocorre a hiperplasia e hipertrofia das células corticais, que levam ao surgimento dos sintomas típicos nas raízes (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996).

Atualmente, existem quatro principais formas de controle de fitonematóides: controle químico, controle biológico, práticas agronômicas e quarentena. No entanto, nenhuma dessas práticas vem obtendo sucesso suficiente. Além disso, o controle químico utilizando nematicidas, forma mais utilizada, tem alto custo, é ineficiente, além de apresentar riscos de contaminação para o meio ambiente e de intoxicação do agricultor e consumidor (JEYARATNAM, 1990). Em relação a agrotóxicos, estima-se que o custo para o controle de fitonematóides pode chegar a três vezes a soma dos gastos com insetos, fungos e plantas daninhas (BIRD e KALOSHIAN, 2003).

Considerando que os programas de melhoramento genético encontram certas dificuldades para geração de variedades resistentes em várias plantas hospedeiras, um grande potencial pode ser reconhecido na engenharia genética (WILLIAMSON e KUMAR, 2006). Por isso, estratégias moleculares visando a transformação genética de plantas têm sido propostas nos últimos 15 anos a fim de induzir resistência em plantas de forma eficiente, ou seja, minimizando o custo de produção e os riscos ambientais. O desenvolvimento de plantas resistentes à nematóides poderia aumentar a produtividade das lavouras e reduzir consideravelmente o impacto causado pelo uso de nematicidas. A busca por genes essenciais que possam ser silenciados e, conseqüentemente, impedir o desenvolvimento do nematóide, é uma estratégia promissora que vem sendo bastante estudada.

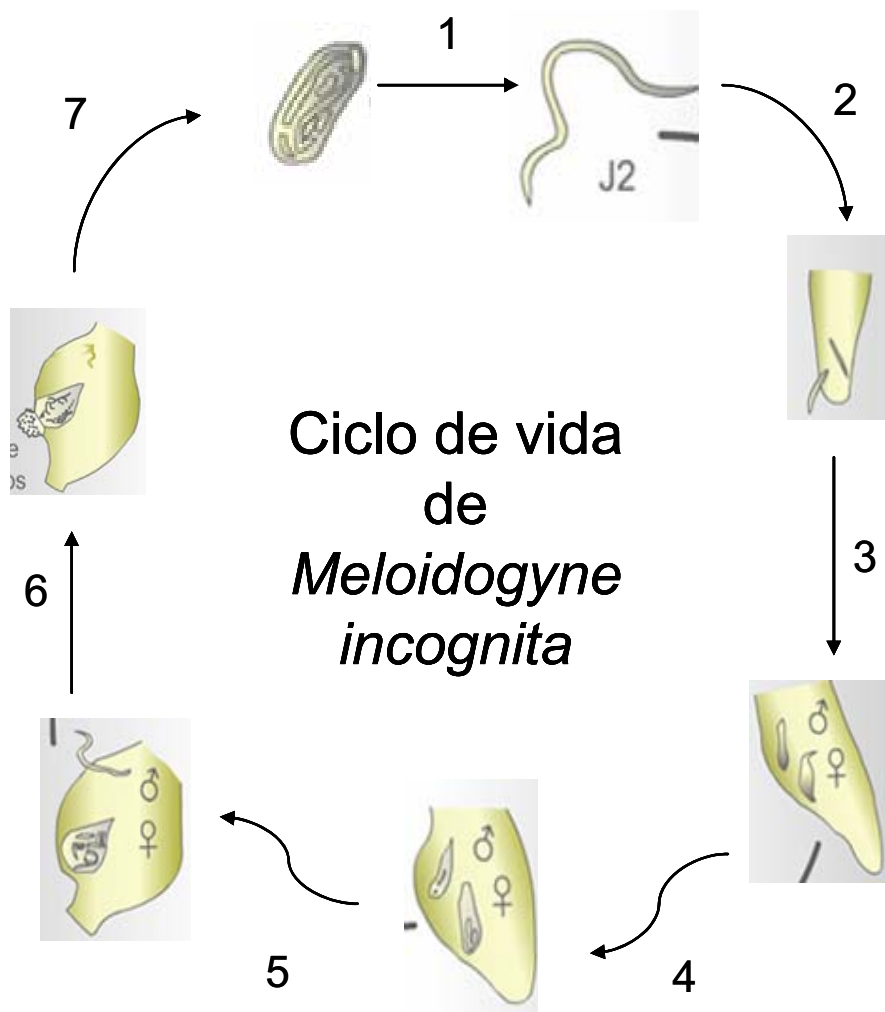


Figura 1. **Ciclo de vida do nematóide *Meloidogyne incognita*.** Devido à íntima e sofisticada interação molecular planta-nematóide os endoparasitas sedentários habitam o hospedeiro interna e permanentemente: (1) juvenil 2 eclode do ovo; (2) juvenil 2 migra no solo, localiza e invade raízes; (3) formação do sítio de alimentação e ecdise em juvenil 3; (4) ecdise em juvenil 4; (5) diferenciação de desenvolvimento, formando macho de vida livre em condições desfavoráveis ou fêmea adulta parasitas; (6) fêmea adulta deposita ovos em massa gelatinosa; (7) ovos são liberados no solo ou continuam na raiz original, completando o ciclo de vida.

1.3. Interferência mediada por RNA

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um fenômeno que ocorre naturalmente nas células e em diversos organismos eucarióticos. Tal processo, descrito primeiramente em plantas, foi denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (JORGENSEN *et al.*, 1996). No entanto, a primeira descrição de silenciamento gênico em animais, assim como sua melhor compreensão, foi obtida em *Caenorhabditis elegans*, nematóide de vida livre e organismo modelo (FIRE *et al.*, 1998). Em plantas, acreditava-se inicialmente que o mecanismo de RNAi era apenas utilizado como defesa contra efeitos da movimentação de transposons, ou ainda, contra infecção por vírus (VOINNET, 2001; WATERHOUSE *et al.*, 2001). Entretanto, atualmente sabe-se que esse processo participa de forma integral na regulação da expressão gênica em várias plantas e outros eucariotos (LILLEY *et al.*, 2007).

A via de RNAi apresenta um processamento inicial comum que se desdobra em quatro etapas funcionais (**Fig. 2**) (BAKHETIA *et al.*, 2005a). Na fase inicial a molécula de RNA fita dupla é reconhecida pelo complexo DICER (“dsRNA-specific RNase III-type endonuclease”). O domínio RNaseIII ATP-dependente desse complexo cliva o dsRNA em pequenos fragmentos de 21-29 pares de bases, denominados siRNAs (“small interfering” RNA). Esses siRNAs primários possuem grupos monofosfatados nas extremidades 5’ e dois pares de bases livres nas extremidades 3’ e são destinados aos quatro caminhos possíveis.

Primeiramente, os siRNAs são separados em fitas simples, e somente a fita antisenso é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA, RISC (“RNA-induced silencing complex”). O complexo RISC, agora ativado, reconhece o transcrito alvo como resultado de um pareamento de bases entre o siRNA fita simples e o mRNA complementar. Por fim, o mRNA é clivado em vários fragmentos e, subsequentemente, degradado pela atividade exonucleásica do complexo RISC, levando ao silenciamento gênico.

Outro destino possível é conhecido como fase de amplificação do silenciamento gênico. Algumas moléculas de siRNAs fita simples agem como iniciadores de polimerização, se ligando a uma enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Usando o mRNA como molde, a RdRp gera novas moléculas de dsRNA específicas, que re-iniciam a geração de mais siRNAs, amplificando exponencialmente o efeito de silenciamento gênico.

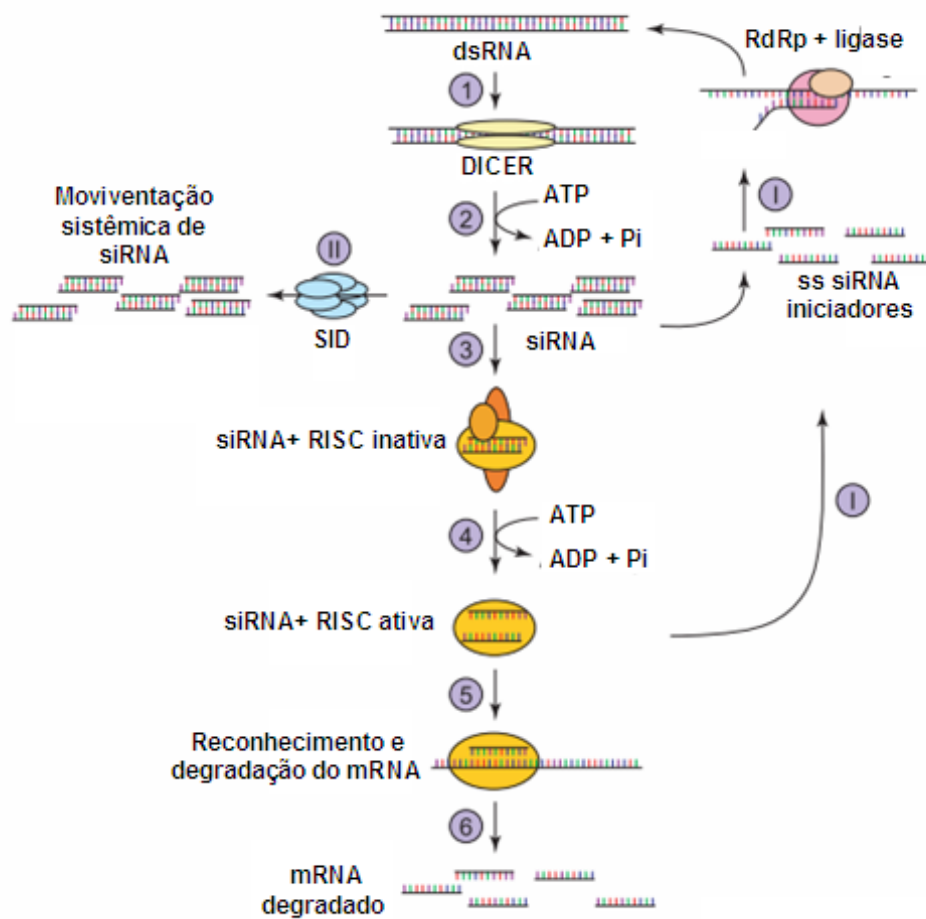


Figura 2. **Via de geração de siRNAs.** O complexo DICER se liga ao dsRNAs, que é clivado em fragmentos de 21-25 pb. Esses siRNAs possuem três destinos: servem de iniciadores para geração de novas moléculas de dsRNAs (I); são transportados de célula em célula através do complexo transmembrânico SID (II) ou são acoplados ao complexo RISC ativando o mesmo, que leva ao reconhecimento do mRNA alvo e sua posterior degradação. Figura retirada e modificada de BAKHETIA *et al.*, 2005.

A terceira etapa, descrita primeiramente no nematóide *C. elegans*, envolve a movimentação sistêmica desses siRNAs. Nesse nematóide, existe um complexo protéico transmembrânico, denominado SID (“systemic RNAi”) que é responsável pela movimentação de siRNAs entre as células, de forma que o silenciamento gênico pode alcançar vários tecidos distantes do foco inicial (WINSTON *et al.*, 2002).

Na quarta etapa, os siRNAs se ligam a RITS (“RNA-induced transcriptional silencing”) e direcionam a condensação da heterocromatina de regiões homólogas, levando ao desligamento dos promotores e conseqüente silenciamento gênico pré-transcricional.

No nematóide de vida livre *C. elegans*, foi provado que o mecanismo de RNAi é sistêmico, duradouro e até hereditário, pois o fenótipo gerado foi mantido por mais de 80 gerações, num experimento de silenciamento de GFP em *C. elegans* GM (VASTENHOUW *et al.*, 2006), justificado provavelmente por silenciamento transcricional, envolvendo o processo de remodelamento da cromatina.

1.4. Plantas geneticamente modificadas usando RNAi

A técnica de silenciamento gênico via RNAi vem sendo muito utilizada em plantas, nematóides e outros organismos como ferramenta para análise da função de diversos genes. Além disso, existem várias aplicações comerciais já descritas, como o tomate com níveis aumentados de carotenóides e flavonóides (DAVULURI *et al.*, 2005) e uma variedade de café descafeinado (OGITA *et al.*, 2004). Uma outra aplicação visa o desenvolvimento de plantas resistentes a insetos praga (GORDON e WATERHOUSE, 2007; ZHU *et al.*, 2008) e fitopatógenos, dentre eles fungos (ROBERTS, 2008) e vírus (BONFIM *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007; TYAGI *et al.*, 2008).

Existem alguns vetores comerciais para expressão de RNAi em plantas (e.g. pK7GWIWG2, pHANNIBAL, pKANNIBAL, pHELLSGATE). Nesses plasmídeos, sob controle de um promotor de origem viral (35SCaMV), o cDNA clonado nos sentidos senso e antisense, separado por um íntron (para formação de alça), é transcrito em um RNA palindrômico de fita dupla (dsRNA), que no interior da célula toma estrutura de grampo.

O potencial do silenciamento gênico como forma de intervenção nas interações moleculares parasita-hospedeiro está em fase de testes mundialmente. Nos últimos anos, o RNAi tem sido empregado como estratégia para a obtenção de plantas

transgênicas com alta resistência a fitonematóides (BAKHETIA *et al.*, 2005b; CHEN *et al.*, 2005; FANELLI *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005). Durante a penetração, os nematóides ingerem citoplasma, onde estão localizados os siRNAs e, uma vez dentro de seu tubo digestivo, os siRNAs têm capacidade de induzir o silenciamento do gene alvo (GHEYSEN e VANHOLME, 2007) (**Fig. 3**).

No caso específico de nematóides parasitas de plantas, a metodologia de “soaking”, que é a incubação de juvenis de segundo estágio com dsRNA para subsequente infecção de plantas para testes *in vivo*, vem sendo muito utilizada. Vários genes-alvo que foram silenciados demonstraram um alto potencial de intervenção do parasitismo por fitonematóides como: genes de proteínases silenciados em nematóides de cistos, *Heterodera glycines* e *Globodera pallida* (URWIN *et al.*, 2002) e nematóide de galha *M. incognita* (SHINGLES *et al.*, 2007); de quitina sintase em *M. artiellia* (FANELLI *et al.*, 2005); de aminopeptidase em *H. glycines*; de celulases em *G. rostochiensis* e *H. glycines* (LILLEY *et al.*, 2005); de proteína de secreção anfideal em *G. rostochiensis* (CHEN *et al.*, 2005); de peptídeos FMRF-like em *G. pallida* (KIMBER *et al.*, 2007); de pectato liase, corismato mutase e peptídeo de secreção SYV46 em *H. glycines* (BAKHETIA *et al.*, 2007); e de oxidase dupla em *M. incognita* (BAKHETIA *et al.*, 2005a).

Além do “soaking”, outra metodologia utilizada é a transformação genética de plantas para produção do dsRNA e indução de resistência à fitonematóides. Usando esta técnica, foram obtidas plantas cuja resistência variou entre parcial e imunidade completa silenciando os genes de: fator de splicing e integrase em *M. incognita* em plantas de tabaco (YADAV *et al.*, 2006); peptídeo de secreção 16D10 em *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* em *Arabidopsis thaliana* (HUANG *et al.*, 2006); proteína principal do esperma em *H. glycines* em soja (STEEVES *et al.*, 2006); fator de transcrição em *M. javanica* em plantas de tabaco (FAIRBAIRN *et al.*, 2007). Esses experimentos de RNAi, seja *in vivo* ou *in planta*, têm elucidado a função de genes individuais, além de representarem uma alternativa eficiente para controle de fitonematóides.

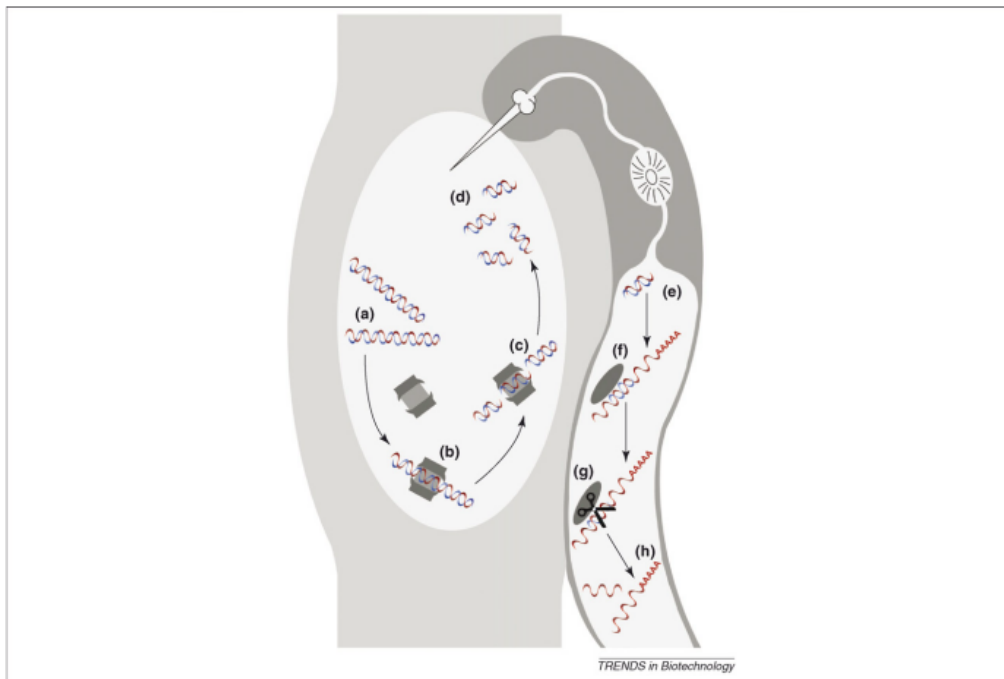


Figura 3. **Representação esquemática do mecanismo de RNAi em *Meloidogyne incognita*.** O juvenil 2 perfura a célula com seu estilete, ingere siRNAs produzidos pela planta geneticamente modificada, quando se alimenta e, a partir do tubo digestivo, ocorre o silenciamento do gene alvo. Figura retirada de GHEYSEN e VANHOLME, 2007.

A transformação de plantas para expressão de RNAi não implica em novas proteínas, o que minimiza as preocupações com biossegurança e alergenicidade, e representa uma forma de controle provavelmente mais eficaz do que as atuais. Dessa forma, para o presente trabalho, quatro genes alvo (Isocitrato Liase, Arginina Quinase, HSP90 e Proteína 14-3-3) foram selecionados devido a sua provável letalidade quando silenciados ou a sua grande abundância em bancos de EST de nematóides.

1.5. Isocitrato Liase

Os nematóides de segundo estágio (J2) possuem um desenvolvimento lento e duradouro, podendo sobreviver no solo por longos períodos sem se alimentar. Esses juvenis pré-parasitas utilizam suas reservas lipídicas, geralmente encontradas em forma de grânulos (**Fig. 4**), para manutenção de seu metabolismo (BIRD e KALOSHIAN, 2003).

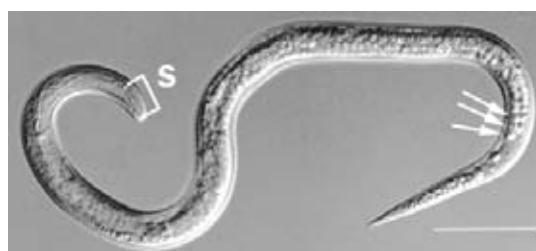


Figura 4. **Juvenil 2 de *Meloidogyne incognita***. As setas indicam uma grande concentração de grânulos de lipídeos, que são essenciais para manutenção do nematóide fora da planta hospedeira. Figura retirada de BIRD e KALOSHIAN, 2003.

O ciclo do glioxilato, via metabólica que ocorre geralmente em plantas e microrganismos e gera carboidratos a partir de lipídeos, está presente nesses nematóides, que provavelmente são os únicos seres do Reino Animalia que o utilizam (MCCARTER *et al.*, 2003). Nessa via, o acetil-CoA oriundo da beta-oxidação de ácidos graxos, se condensa com o oxaloacetato para formação de citrato que, subsequentemente, é convertido à isocitrato da mesma forma que no ciclo de Krebs. A diferença entre os dois ciclos aparece no processamento do isocitrato. No ciclo do glioxilato, o isocitrato é clivado pela Isocitrato Liase (IL), gerando succinato e glioxilato. O glioxilato, por sua vez, se condensa com uma nova molécula de acetil-

CoA, reação catalisada pela enzima malato sintase, que leva à formação de malato, posteriormente convertido em oxaloacetato, iniciando um novo ciclo. Cada volta no ciclo consome duas moléculas de acetil-CoA e gera uma molécula de succinato. O succinato entra no ciclo de Krebs e gera oxaloacetato, que é convertido até fosfoenolpiruvato, um precursor da gliconeogênese (**Fig. 5**). Os nematóides, aparentemente, utilizam essa via para sobrevivência durante o período em que ficam no solo sem se alimentar.

Uma EST codificadora de IL já havia sido identificada em J2 de *M. incognita* (MCCARTER et al., 2003), além de um cDNA completo de IL isolado de *M. javanica* (gi|15003598). O isolamento do fragmento gênico de IL para sua utilização como gene alvo foi planejado devido a menor probabilidade de ocorrerem efeitos cruzados indesejados nos consumidores, visto que esse gene é inexistente em vertebrados.

1.6. Arginina Quinase

Arginina Quinase (AQ) é uma enzima, encontrada apenas em invertebrados, pertencente à família das fosfoquinases, que possui um papel crucial na mobilização de energia. Essa enzima catalisa uma reação reversível, magnésio dependente, denominada transfosforilação: N-fosfo-L-arginina + ADP → ATP + L-arginina. Já foram descritas diversas isoformas dessa enzima em invertebrados, como *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Apis mellifera*, *Steinernema carpocapsae* entre outros.

Em *D. melanogaster*, mostrou-se que a AQ está localizada nas fibras musculares e, portanto, que está envolvida nos processos de contração muscular (LANG et al., 1980). No nematóide parasita de insetos *S. carpocapsae*, a AQ além de participar na movimentação dos músculos, também está envolvida no armazenamento de energia nas fases de J3 e adulto. Quando submetidos à uma condição de estresse, como por exemplo hipóxia, esses nematóides utilizam essa enzima para rapidamente disponibilizarem energia durante a transição do metabolismo aeróbico para o anaeróbico. Esses resultados sugerem que, além de possuir um papel na contração muscular, a enzima AQ possui uma função crucial na disponibilização de ATP em períodos de estresse (PLATZER et al., 1999). Assumindo que, durante o ciclo de vida do nematóide ocorram inúmeras situações de estresse, é de se esperar que o gene da AQ seja expresso constitutivamente durante o desenvolvimento do nematóide. No nematóide formador de cisto, *H. glycines*, foi confirmada expressão constitutiva de AQ durante todos os estádios de desenvolvimento (MATTHEWS et al., 2003).

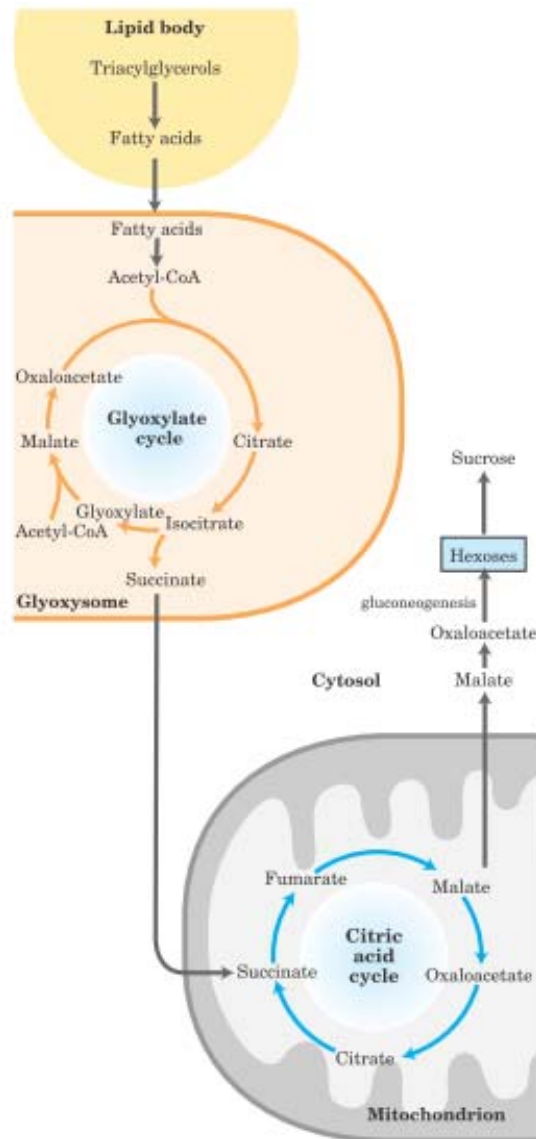


Figura 5. **Integração entre o ciclo do glioxilato (CG) e o ciclo de krebs (CK).** As reações do ciclo do glioxilato (glioxissomo) e do ciclo de krebs (mitocôndria) acontecem simultaneamente. O succinato gerado no CG sai do glioxissomo, entra na mitocôndria e participa do CK, aonde vai ser convertido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

Os genes codificadores de AQ são abundantes no banco de EST de nematóides, sugerindo um papel essencial na sobrevivência desses animais. Além disso, vertebrados não possuem AQ, o que o torna um ótimo gene candidato para controle de fitonematóides parasitas usando RNAi *in planta*.

1.7. Proteína de Choque Térmico 90

As proteínas de choque térmico são caracterizadas por serem ativadas nas células em períodos de estresse físico ou químico (INOUE *et al.*, 2006). Sabe-se também que elas funcionam como chaperonas moleculares, com papel essencial no enovelamento e transporte de proteínas (CSERMELY *et al.*, 1998). Especificamente, a proteína HSP90 (“Heat Shock Protein 90”) se difere das demais, já que sua interação com outras moléculas ocorre independentemente de estresse (DEVANEY *et al.*, 2005). A interação de HSP90 ocorre com uma gama de sinalizadores e receptores cruciais na apoptose e divisão celular.

Em *C. elegans*, uma proteína homóloga à HSP90 denominada DAF-21, é requerida para o desenvolvimento normal dos juvenis 1 (J1) e também para manutenção de comportamentos quimiossriais (BIRNBY *et al.*, 2000). Essa proteína é predominantemente expressa nas células germinativas (INOUE *et al.*, 2003), entretanto, observou-se que a proteína HSP90 também é crucial em nematóides adultos, já que após a ingestão do dsRNA específico houve, além da morte embriogênica da progênie, o cessamento da produção de ovos (PIANO *et al.*, 2000). O silenciamento do gene *daf-21* realizado em ovos de *C. elegans* resultou em morte precoce do J1 (RIDDLE, 1999), defeitos severos na oogênese, esterilidade e morte embriogênica (PIANO *et al.*, 2000). A inibição da atividade de HSP90, utilizando um potente inibidor específico (geldanamicina) demonstrou um efeito letal em *Brugia pahangi*, nematóide parasita de humano. Esse tratamento causou interrupção da produção de ovos, morte embrionária e morte de nematóides adultos (DEVANEY *et al.*, 2005).

1.8. Proteína 14-3-3

As proteínas do tipo 14-3-3 são amplamente encontradas em todos os organismos eucariotos. Essas chaperonas multifuncionais estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo transdução de sinal, apoptose, controle do ciclo celular, resposta a estresse e organização do citoesqueleto (CAILLAUD *et al.*, 2008). Elas

desempenham essas funções alterando a localização sub-celular, estabilidade, fosforilação e interações moleculares de seus ligantes (JIN *et al.*, 2008).

No nematóide *C. elegans*, foi provado que as proteínas FTT-2 e PAR-5, membros da família 14-3-3, são responsáveis pela ligação ao fator de transcrição DAF-16 (“forkhead transcription factor”) e pela sua retenção no citoplasma. (BERDICHEVSKY e GUARENTE, 2006). Por sua vez, o dímero DAF-16/14-3-3 interage com a proteína SIR-2.1, uma desacetilase, ativando uma resposta a estresse e aumentando a longevidade de *C. elegans*. O silenciamento dos genes *fit-2* e/ou *par-5*, impossibilitou a formação do trímero funcionalmente ativo DAF-16/14-3-3/SIR-2.1 (Fig. 6), que resultou em maior susceptibilidade a estresse, retenção de ovos nos adultos, menor longevidade e morte precoce (BERDICHEVSKY *et al.*, 2006).

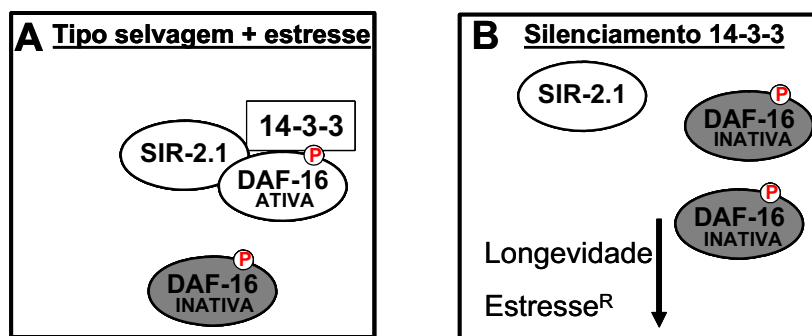


Figura 6. **Representação esquemática do modelo funcional de resposta a estresse térmico.** (A) A formação do trímero DAF-16/14-3-3/SIR-2.1 atua no núcleo ativando a resposta a estresse e aumentando a longevidade do nematóide. (B) O silenciamento do gene 14-3-3 impossibilitou a formação do trímero, conseqüentemente, o DAF-16 permaneceu inativo, reduzindo a resposta à estresse e longevidade dos nematóides. Figura modificada de BERDICHEVSKY e GUARENTE, 2006a.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar fragmentos gênicos de Isocitrato Liase, Arginina Quinase, proteína 14-3-3 e HSP90, subclonar os mesmos em vetor para RNAi *in planta* e determinar o padrão de expressão gênica nos três estádios de desenvolvimento (ovo, juvenil 2 e fêmea) de *M. incognita*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. – Isolar um fragmento gênico de Isocitrato Liase de *M. incognita*.

2.2.2. – Amplificar os fragmentos gênicos de Arginina Quinase, HSP90 e 14-3-3 de uma biblioteca de cDNA de *M. incognita*.

2.2.3. – Subclonar os quatro fragmentos gênicos em plasmídeo para RNAi visando transformação genética de plantas.

2.2.4. – Determinar o padrão de expressão dos genes candidatos por PCR em tempo real nas três fases de desenvolvimento do nematóide (ovo, juvenil 2 e fêmea).

2.2.5. – Transformar *Nicotiana tabacum* utilizando a técnica de co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*.

3 – METODOLOGIA

3.1. Cultura de Nematóides

Os fitonematóides endoparasitas obrigatórios são cultivados em plantas hospedeiras. Assim, *M. incognita* foi inoculado em *Solanum lycopersicum* (tomateiro), da variedade susceptível Santa Cruz e cultivar Kada Gigante. Então, objetivando a multiplicação e a manutenção desses nematóides, as sementes de tomateiro foram germinadas em bandeja, transferidas após duas semanas para sacos plásticos de 20 L. Quando atingem de 30 a 40 centímetros de altura, os tomateiros já podem ser infectados com nematóides. A partir de 28 dias após infecção (dpi), as raízes apresentam galhas e os nematóides podem ser coletados nas diferentes fases de vida.

3.2. Extração de Ovos

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

3.3. Extração de Juvenis J2

A produção de juvenis infectivos (J2) de nematóides parasitas de plantas se baseia no sistema de eclosão *in vitro*. Foram utilizadas pequenas vasilhas e peneiras, ambas de plástico (uso doméstico) e de mesmo diâmetro. Água destilada estéril é adicionada as vasilhas, que apóiam as peneiras forradas com dupla camada de papel toalha, aonde os ovos coletados são depositados. Espontaneamente, os ovos se desenvolvem em juvenis J1, que continuam retidos na cutícula do ovo.

Subseqüentemente, esses juvenis J1 se desenvolvem em juvenis J2 que eclodem, migrando do papel toalha para a vasilha e sedimentando no fundo do recipiente. Os juvenis J2 são então coletados por centrifugação a 2500 x g por 30 minutos em tubo Falcon de 50 mL. Após a retirada cuidadosa do sobrenadante, os juvenis J2 são ressuspensos em volume menor e transferidos para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorf) e novamente centrifugados a 7000 x g por 3 minutos. Toda água é retirada e os juvenis J2 são imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a - 80 °C.

3.4. Extração de Fêmeas

A extração de fêmeas se inicia com a separação cuidadosa de solo do sistema radicular, utilizando água corrente. As raízes são picotadas com tesoura e incubadas em solução de pectinase 25% (v/v) por 16 horas. Após, o tecido radicular amolecido libera as fêmeas, que são lavadas, ficando retidas em peneira de 100 mesh. Em seguida, são sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 10 minutos em suspensão de caulim (substrato inerte). Após a ressuspensão do precipitado em sacarose 40% (m/v), segue-se nova centrifugação a 2500 x g por 1 minuto. As fêmeas, concentradas sobre a solução de sacarose, são retidas em peneira de mesma malha, lavadas com água destilada e transferidas para béquer. Uma separação visual, com micropipeta de 1 mL (P1000), assegura maior integridade e pureza das fêmeas coletadas. Usam-se duas ponteiros azuis, uma cortada para pipetar as fêmeas, sem danificá-las, para um tubo de microcentrífuga e outra amassada na ponta para retirar a sujeira residual da coleta. Após, a amostra é sedimentada por centrifugação a 2000 x g por 1 minuto para completa retirada de água e armazenada a - 80 °C. Em média, obteve-se 8 mg de fêmeas por grama de raiz.

3.5. Extração de RNA total

O RNA total de ovos, juvenis J2 e fêmeas adultas de *M. Incognita* foi extraído utilizando o kit RNASpin Mini RNA Isolation (G&E), seguindo as instruções do fornecedor. A purificação baseia-se na adsorção diferencial do RNA a uma membrana de sílica, sob alta concentração salina, enquanto DNA e proteínas são eliminados por múltiplas lavagens. Resumidamente, ovos, juvenis ou fêmeas são lisados e homogeneizados em tampão desnaturante, com isotiocianato de guanidina, a fim de

inibir a atividade ribonucleásica endógena e o lisado é aplicado numa microcoluna contendo a membrana de sílica. A coluna é então lavada três vezes e o RNA eluído com água MilliQ e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6. Reação de Transcrição Reversa

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

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) a partir de RNA total de ovos, juvenis J2 e fêmeas de *M. incognita*. Inicialmente, 5 μg de RNA total, 1 μM do oligodT (**Anexos**) e 10 mM de dNTP's foram incubados a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para quebrar estruturas secundárias e permitir o anelamento do oligonucleotídeo. Posteriormente, essa reação foi incubada no gelo por 2 minutos. Uma mistura de reação, contendo 50U da enzima transcriptase reversa Superscript™ II RT, 2 mM MgCl_2 , 5 mM DTT e 1U de RNase Out, foi incubada a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. A transcriptase reversa foi inativada a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por fim, foram adicionadas 2U de RNase H e a reação foi incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos e o cDNA armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7. RT-PCR

O RT-PCR é uma reação da polimerase em cadeia que utiliza como molde o cDNA, ou seja a fita simples e antisenso, reversa e complementar, ao mRNA. Essa técnica oferece uma maneira prática de isolar genes que estão sendo expressos, ou pelo menos transcritos, na condição espacial e temporal na qual o RNA fora extraído. A fração gênica que codifica mRNAs é muito pequena em relação ao genoma completo e os genes de interesse geralmente estão “diluídos”. Assim, evita o isolamento de produtos inespecíficos como pseudogenes ou regiões não codificadoras presentes no genoma. Ao mesmo tempo, ao partir de cDNA, apenas a seqüência codificadora é amplificada, sem os íntrons, que podem aumentar muito o tamanho do gene isolado de gDNA, dificultando a amplificação, clonagem e seqüenciamento.

O fragmento gênico codificador da Isocitrato Liase foi amplificado por RT-PCR a partir de cDNAs de ovo, J2 e fêmea, utilizando oligonucleotídeos específicos.

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir de uma seqüência de *Meloidogyne javanica* retirada do GenBank (gi|15003598).

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

3.8. Amplificação dos fragmentos gênicos da biblioteca de cDNA de Juvenis 2

Os fragmentos gênicos de AQ, HSP90 e 14-3-3 foram amplificados de uma biblioteca de cDNA de juvenis 2 de *M. incognita* por meio da técnica de PCR. Os parâmetros utilizados foram os mesmos citados anteriormente, com alteração apenas nas temperaturas de anelamento. Para AQ e HSP90, foi utilizado 1µL de cinco amostras distintas como molde e temperatura de anelamento de 50 °C. Para 14-3-3, foi utilizado 1µL de uma amostra, não diluída e diluída 30 vezes, e realizado um gradiente de temperatura de anelamento 45 °C, 50 °C e 55 °C.

3.9. Clonagem e Extração de DNA plasmidial

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

3.10. Seqüenciamento e Análise das Seqüências

Os fragmentos clonados (500 ng de vetor) foram seqüenciados num seqüenciador automático ABI 3100 para confirmação, utilizando-se 4 pmoles de oligonucleotídeos T7 e SP6. As seqüências obtidas foram submetidas contra o banco de dados do GenBankTM pelos programas BLASTn e BLASTp, no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Alguns parâmetros (Tm, %GC, loop, homodímero) foram gerados pelo programa Oligotech (<http://www.oligotech.com/analysis.php>) para auxiliar no desenho dos oligonucleotídeos (**Anexos**).

3.11. Subclonagem em Vetor para RNAi

Cada fragmento gênico foi clonado primeiramente no plasmídeo de entrada pDONR221 do sistema Gateway[®] (Invitrogen) (**Fig. 7**). A reação de recombinação foi realizada utilizando-se 300 ng do produto de PCR, contendo os sítios de recombinação *attB*, 300 ng do vetor pDONR221, com os sítios *attP*, e 100U da recombinase BP ClonaseTM II (**Fig. 8A**). A reação foi incubada a 25 °C durante 16 horas. Para inativação da recombinase, foi adicionado 1 µL de Proteinase K à reação, que foi incubada a 37 °C por 10 minutos. Para propagação dos vetores, foi realizado choque térmico de células competentes de *E. coli*, linhagem *One Shot TOP10* (Invitrogen), seguindo os parâmetros: 30 minutos no gelo, 30 segundos a 42 °C e dois minutos no gelo. As células foram ressuspensas em 250 µL de meio LB (Luria-Bertani) e mantidas a 37 °C por uma hora. Logo em seguida, foram semeadas em placas com meio LB sólido contendo o antibiótico canamicina (100 µg/mL). A seleção de clones positivos do sistema Gateway[®] baseia-se em seleção negativa devido a presença do gene letal *ccdB*. A proteína CcdB interfere na atividade da DNA Girase de *E. coli*, inibindo o seu crescimento. Quando a recombinação ocorre, há a substituição do gene *ccdB* pelo gene de interesse, portanto apenas as células que possuem o fragmento gênico de interesse clonado no pDONR221 crescerão em meio seletivo com antibiótico canamicina. A partir dessa etapa, todos os plasmídeos recombinados devem ser mantidos na linhagem TOP 10, que são susceptíveis aos efeitos do gene *ccdB*, permitindo a seleção apenas dos clones que possuem o vetor corretamente recombinado. As preparações de DNA plasmidial foram feitas em

pequena escala por lise alcalina, seguindo-se metodologia padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989).

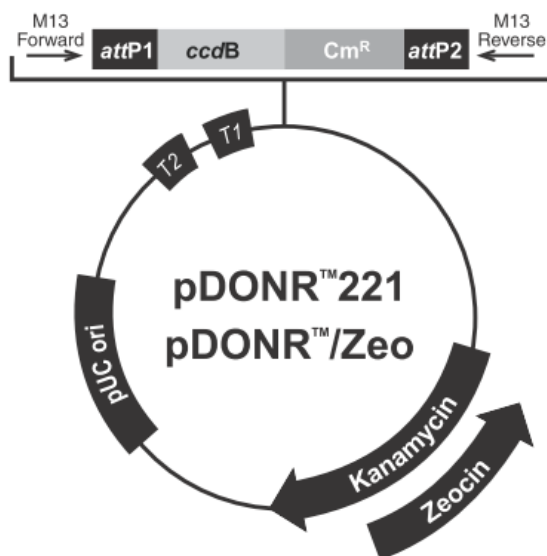
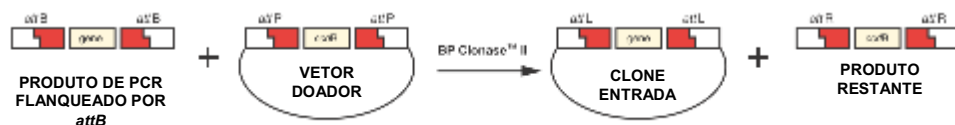


Figura 7. **Desenho esquemático do plasmídeo de entrada pDONR221.** Os sítios de recombinação *attP1* e *attP2* flanqueiam o gene letal *ccdB* e o gene de resistência ao antibiótico clorafenicol, que são substituídos pelo fragmento gênico após a reação de recombinação.

A presença dos fragmentos gênicos subclonados no plasmídeo pDONR221 foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos. Os vetores foram seqüenciados com os oligos M13 senso e M13 antisense para confirmação definitiva. Finalmente, foi montado o sistema de recombinação com o vetor destino para RNAi *pk7GWIWG2(I)* (**Fig. 9**). A reação de recombinação foi realizada usando 300 ng do pDONR221 contendo o fragmento gênico de interesse flanqueado pelos sítios de recombinação *attL* (oriundo da recombinação do *attB*), 300 ng do vetor *pk7GWIWG2(I)*, contendo os sítios de recombinação *attR*, 15U de Topoisomerase I para manter o vetor destino desenovelado e 100U da recombinase LR clonase TM II (**Fig. 8B**). A reação foi incubada a 25 °C durante 16 horas. Ao final, foi adicionado 1µL de Proteinase K e a reação incubada a 37 °C por 10 minutos para inativação da enzima. Os vetores obtidos foram usados para transformação por choque térmico de *E. coli* linhagem *One Shot TOP10*. A seleção de clones positivos baseia-se na mesma metodologia descrita anteriormente. Após a confirmação da sub-clonagem dos fragmentos gênicos por PCR com oligos específicos e digestão com endonucleases de restrição, os plasmídeos foram introduzidos por eletroporação na linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

A



B

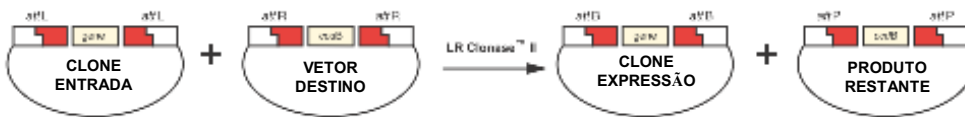


Figura 8. Representação esquemática para clonagem de genes utilizando a metodologia Gateway®. (A) A primeira reação de recombinação, catalisada pela enzima BP clonase, utiliza o produto de PCR amplificado com os sítios de recombinação *attB* e o vetor doador contendo os sítios de recombinação *attP* para geração do vetor de entrada. (B) A segunda reação de recombinação, catalisada pela enzima LR clonase, utiliza o vetor de entrada contendo os sítios de recombinação *attL* e o vetor destino contendo os sítios de recombinação *attR* para geração do vetor final.

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

As folhas de plantas de tabaco micropropagadas *in vitro* foram retiradas e cortadas em quadrados de aproximadamente 1,0 cm². Os fragmentos foliares foram transferidos imediatamente para meio MS líquido (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e em seguida foi adicionado 200 µL da suspensão bacteriana ao meio, que foi agitado delicadamente. Os explantes foram incubados nesse meio durante 20 minutos para possibilitar a infecção com agrobactéria, transferidos para MS sólido e incubados no escuro por um período de 48 horas. Posteriormente, os explantes foram transferidos para um novo meio MS sólido contendo 1 mg/L do hormônio 6-benzilaminopurina (BAP) para indução de brotos, 500 mg/L de cefotaxima para evitar o crescimento das agrobactérias remanescentes e 100 mg/L de canamicina para selecionar as células transformadas. Os explantes foram incubados em uma sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25 °C.

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

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

A análise da expressão diferencial dos quatro genes-alvo foi realizada utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real, normalizado pela expressão

dos genes constitutivos 18S rRNA e actina. Para análise do padrão de expressão gênica foi feita qRT-PCR comparando os três estádios de desenvolvimento, ovo, J2 e fêmea. Os experimentos de qRT-PCR foram conduzidos no termociclador Mastercycler realplex (Eppendorf) e todos reagentes foram pipetados pelo robô Epmotion 5070 (Eppendorf).

A partir de 1 µg de RNA total extraído de ovo, J2 e fêmea, foi sintetizado o cDNA utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen), seguindo as indicações do fabricante. A PCR continha os seguintes reagentes: SYBR® GreenER™ qPCR Super Mix 1X (Invitrogen); 100 nM de cada primer (senso e antisenso) e cDNA de ovo, J2 e fêmea. O programa da PCR foi o seguinte: 95 °C por dez minutos, 95 °C por trinta segundos, 55 °C por vinte segundos e 68 °C por vinte segundos repetidos por 65 ciclos. Após a amplificação, foi determinada a curva de “melting” para verificar a presença de amplificação inespecífica ou formação de dímeros entre os oligonucleotídeos, cujo programa foi: 95 °C por quinze segundos, 60 °C por quinze segundos, subindo 2 °C por minuto, até chegar à 95 °C novamente.

O reagente SYBR® GreenER™ é uma molécula intercalante de dsDNA. Quando excitado pelo LED, o SYBR® intercalado emite fluorescência de 520 nm, captado pelo termociclador nas etapas de extensão. Na medida que a reação ocorre, os dados de fluorescência são tomados, em tempo real, e plotados em função do ciclo de amplificação. O valor utilizado para análise é o Ct (“cycle threshold”), que corresponde ao ciclo de amplificação aonde a fluorescência detectada é 10 vezes o ruído dos ciclos iniciais.

Para a análise de expressão gênica é fundamental a determinação da eficiência de amplificação (PFAFFL, 2001), calculada pela seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$. Sendo que, o coeficiente angular, corresponde a inclinação da reta obtida por regressão linear dos valores de Ct em função do log das diluições de cDNA (curva padrão). Os dados gerados foram analisados pelo programa “Relative expression software tool” (REST) (PFAFFL *et al.*, 2002). Este programa recebe os dados brutos de Ct para cálculo de eficiência de amplificação, normalização com os genes constitutivos e comparação de genes de interesse em diferentes tratamentos, gerando gráfico de log2.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. – Seleção de genes-alvo para controle de *Meloidogyne incognita*

Quatro genes-alvo foram selecionados para testes preliminares visando o controle de *M. incognita* por meio de RNAi. Os genes codificadores de Arginina Quinase e Proteína de Choque Térmico 90 foram escolhidos para silenciamento gênico porque foram abundantes numa biblioteca de cDNA de juvenil 2 de *M. incognita* (FRAGOSO, 2006), além de demonstrarem grande potencial de intervenção no desenvolvimento de nematóides (BERDICHEVSKY *et al.*, 2006; DEVANEY *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2003). O gene da proteína 14-3-3, previamente caracterizado e isolado da secreção salivar de J2 de *M. incognita*, (JAUBERT *et al.*, 2004) foi selecionado devido a potencial multifuncionalidade dessa proteína. A sua participação na regulação do ciclo celular, transcrição, apoptose, organização do citoesqueleto, atividades metabólicas e no desenvolvimento de parasitas de animais (SILES-LUCAS MDEL e GOTTSTEIN, 2003) sugere que essa proteína é importante para o estabelecimento da interação entre o nematóide e a planta hospedeira. O gene codificador de Isocitrato Liase foi selecionado porque está envolvido no metabolismo energético (ciclo do glioxilato) de juvenil 2 pré-parasita e, por isso, representa um bom candidato para controle de fitonematóides (BIRD e KALOSHIAN, 2003).

4.2. – Análise de seqüências e desenho dos oligonucleotídeos

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

seqüência nucleotídica. A intersecção das probabilidades de maior eficiência de RNAi com menor efeito cruzado resultou nas regiões escolhidas para isolamento e clonagem em vetor para RNAi.

Foi planejado utilizar apenas uma região para cada gene-alvo, resultando em quatro fragmentos gênicos para amplificação. Então, a partir das seqüências nucleotídicas das regiões escolhidas, os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificação por PCR dos fragmentos gênicos e adição das extremidades de reconhecimento *attB* para subclonagem por recombinação (Gateway® Technology).

4.3. – Amplificação e seqüenciamento dos fragmentos gênicos selecionados

A partir de fitonematóides *M. incognita* multiplicados em plantas de tomateiro, procedeu-se a coleta de indivíduos em diferentes fases de desenvolvimento (ovo, J2 e fêmea). Essas amostras de *M. incognita* foram submetidas a extração de RNA total e síntese de cDNA em pequena escala. Inicialmente, a qualidade do cDNA foi testada em RT-PCR com oligonucleotídeos para β -actina (**Fig. 10**). Posteriormente, foram iniciadas as amplificações para isolamento do fragmento gênico de Isocitrato Liase. Foram utilizados como molde cDNA de ovo, J2 e fêmea para a primeira PCR, com temperatura de anelamento de 45 °C. Em seguida, foi realizada uma segunda amplificação que utilizou como molde 1 μ L da primeira reação de PCR e temperatura de anelamento de 50 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (**Fig. 11**).

Os demais fragmentos gênicos foram amplificados usando como molde o DNA plasmidial da biblioteca de J2 (pSPORT Invitrogen), contendo os cDNAs previamente isolados e seqüenciados (FRAGOSO, 2006). Para amplificação de AQ e HSP90, foram utilizados cinco moldes distintos de DNA plasmidial e temperatura de anelamento de 50 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (**Fig. 12 e 13**). Para amplificação de 14-3-3, foi utilizado um único molde de DNA plasmidial. A PCR foi realizada utilizando o DNA não diluído e diluído 1:30 e um gradiente para as temperaturas de anelamento de 45 °C, 50 °C e 55 °C (**Fig. 14**). Todos os fragmentos gênicos foram subclonados no vetor pGEMT-easy (Promega) e seqüenciados em triplicata utilizando os oligos

universais SP6 e T7 para confirmar se o produto amplificado realmente era o fragmento gênico de interesse.

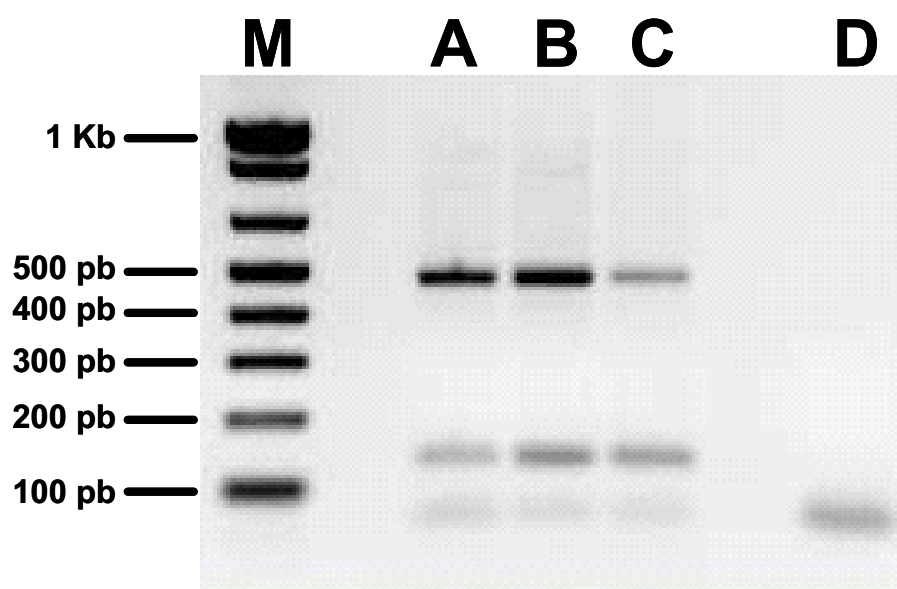


Figura 10. **Amplificação do fragmento gênico de β -actina.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de RT-PCR utilizando como molde os cDNAs de *Meloidogyne incognita* nas fases de ovo (A), juvenil 2 (B) e fêmeas adultas (C). Controle negativo da reação de PCR (D). Os tamanhos dos fragmentos amplificados (~ 500 pb) foram comparados com o marcador de massa 1 kb ladder plus da Invitrogen™ (M).

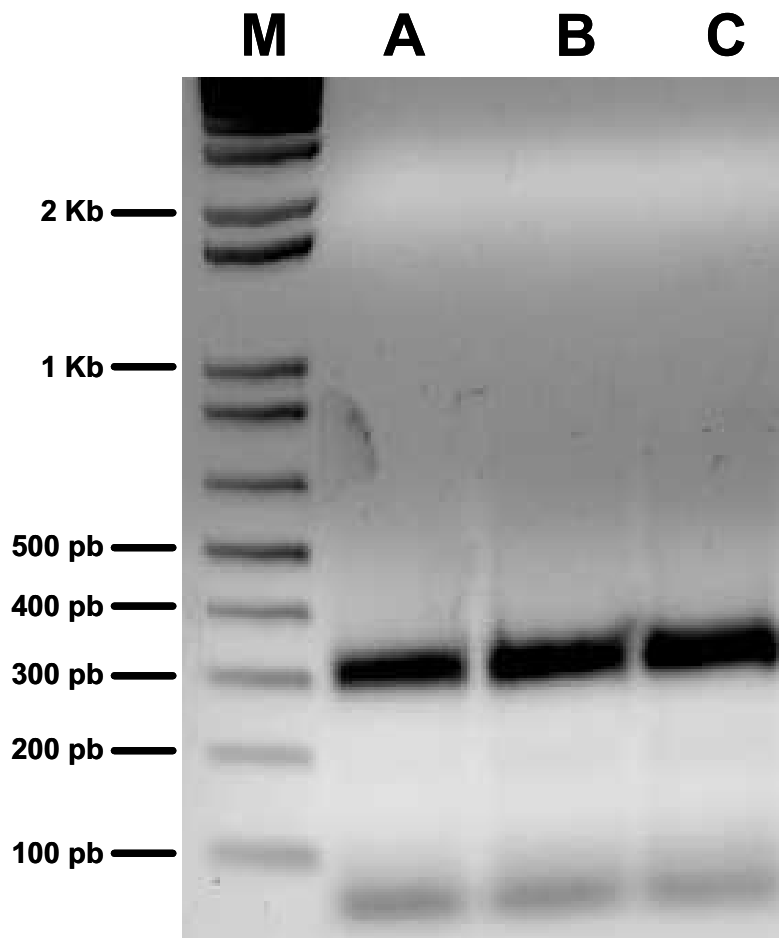


Figura 11. **Amplificação do fragmento gênico de Isocitrato Liase.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de RT-PCR utilizando como molde os cDNAs de *Meloidogyne incognita* nas fases de ovo (A), juvenil 2 (B) e fêmea adulta (C). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o marcador de massa 1 kb ladder plus da InvitrogenTM (M).

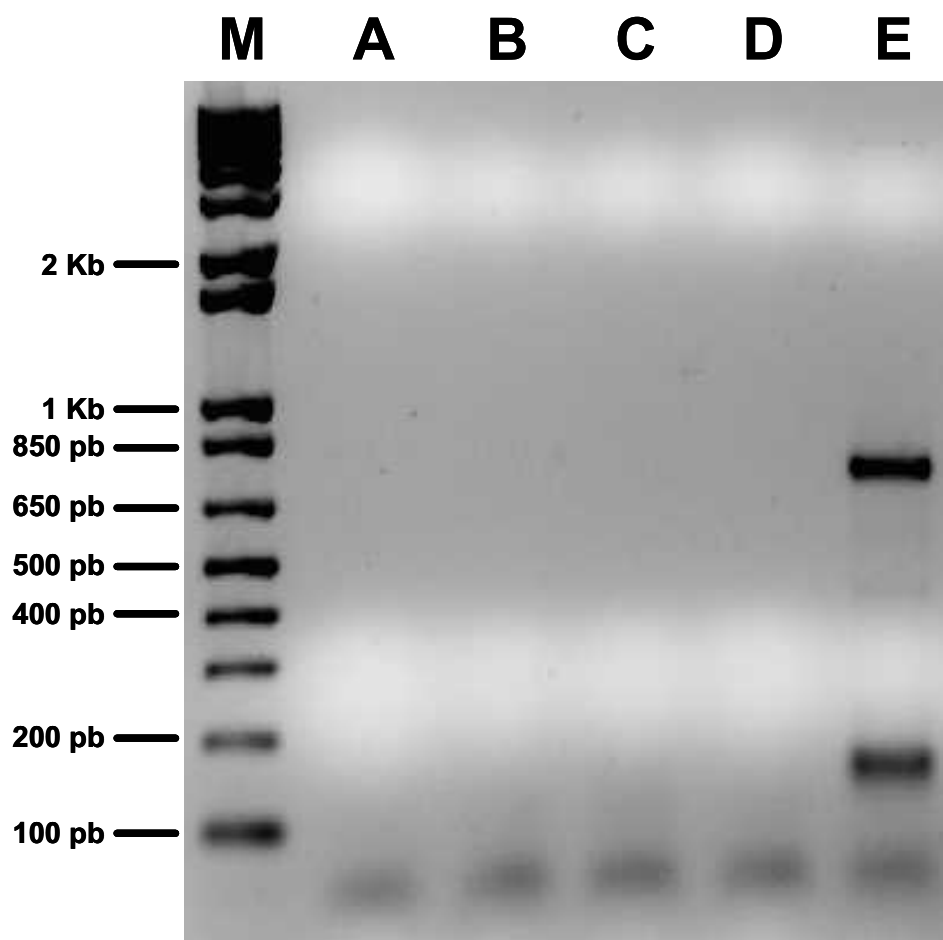


Figura 12. **Amplificação do fragmento gênico de Arginina Quinase.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando com molde clones de uma biblioteca de cDNA de juvenil 2 de *Meloidogyne incognita*. (A–D) clones que não amplificaram o fragmento de interesse; (E) amplificação do fragmento de interesse de 728 pb, além de fragmento inespecífico próximo de 200 pb. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™ (M).

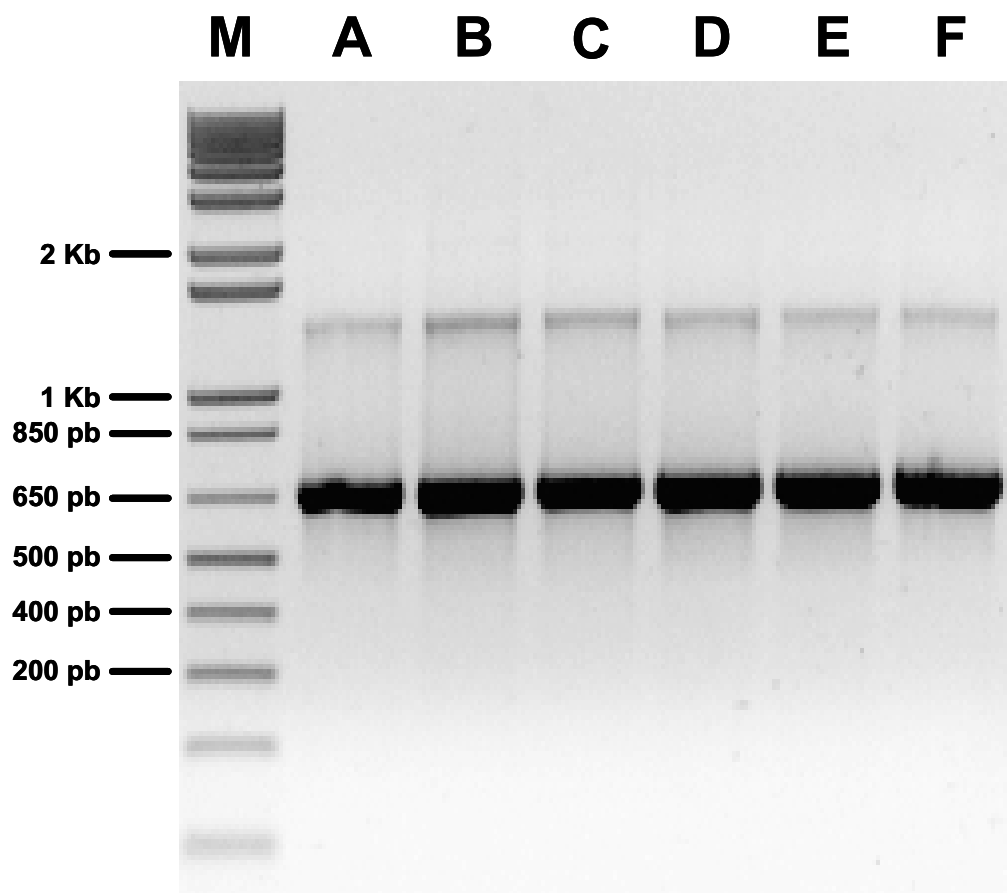


Figura 13. **Amplificação do fragmento gênico de 14-3-3.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando com molde um único clone de uma biblioteca de cDNA de juvenil 2 de *Meloidogyne incognita* em diferentes condições. (A–C) o molde utilizado foi o DNA plasmidial do clone diluído 1:30. (D–F) o molde utilizado foi o DNA plasmidial sem diluição. Foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento com temperaturas de: 45 °C (A e D), 50 °C (B e E) e 55 °C (C e E). Em todas as condições testadas o produto de PCR de 660 pb, correspondente ao fragmento gênico de interesse, foi amplificado. Marcador de massa molecular 1 kb ladder da Invitrogen™ (M).

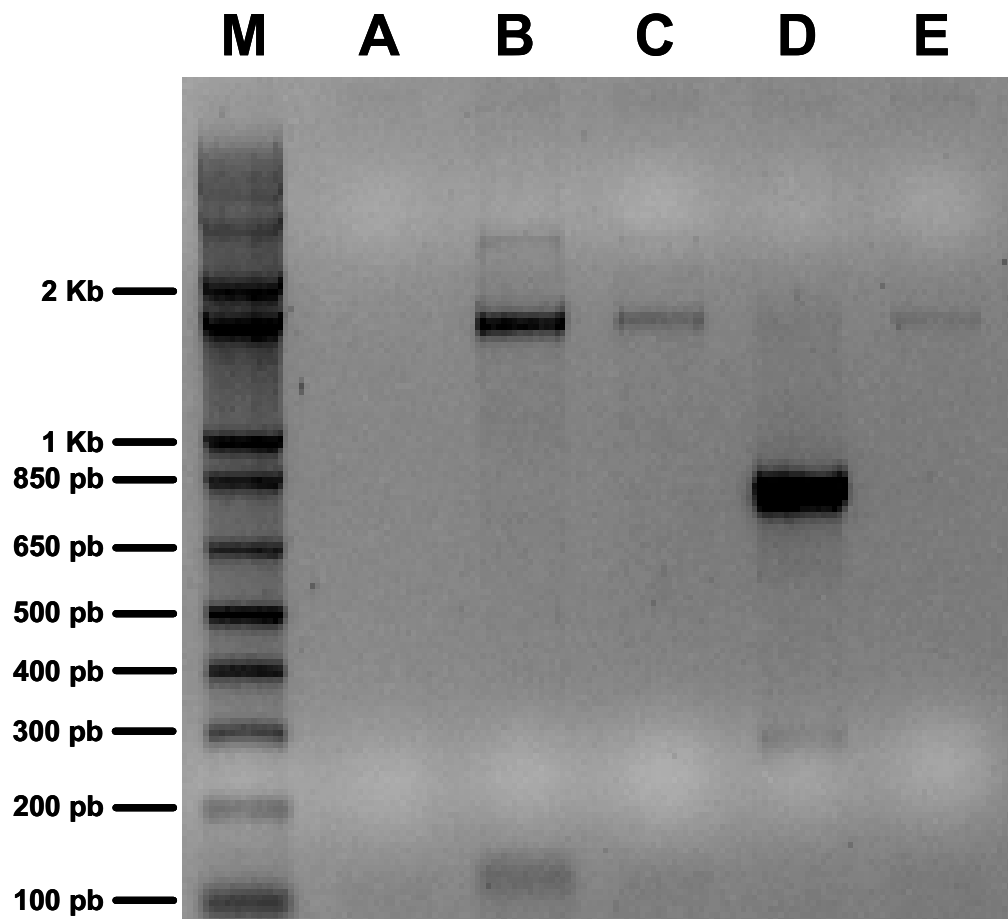


Figura 14. **Amplificação do fragmento gênico de HSP90.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR utilizando com molde clones de uma biblioteca de cDNA de juvenil 2 de *Meloidogyne incognita*. (A, B, C e E) clones que não amplificaram o fragmento de interesse; (D) amplificação do produto de PCR de 782 pb, correspondente ao fragmento de gênico de HSP90. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™.

Partindo do produto da PCR, flanqueado por seqüências de recombinação *attB*, foi realizada a recombinação no pDONR utilizando a enzima BP Clonase. Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados em triplicata utilizando os oligos M13 senso e M13 antisenso para confirmação das seqüências. Posteriormente, foram obtidas as seqüências consenso, que foram novamente submetidas ao BLASTn para verificação de possíveis efeitos cruzados com organismos não alvo, como por exemplo plantas, humanos, insetos (**Tab. 1**). Após análise detalhada do resultado obtido no BLASTn, esse vetor foi utilizado para uma nova recombinação com o vetor destino pK7GWIWG2(I).

Tabela 1. Comparações dos genes-alvo com o GenBank™.

Gene-alvo	BLASTn*	Espécie	E-value	Identidade	Nº de acesso
Isocitrato Liase	NSSE	–	–	–	–
Arginina Quinase	NSSE	–	–	–	–
HSP90	HSP90	<i>M. incognita</i>	0,0	97%	EU364881
		<i>M. javanica</i>	0,0	97%	AF201338
		<i>M. arenaria</i>	0,0	97%	EU364880
		<i>M. floridensis</i>	0,0	97%	EU364884
			0,0	97%	EU364885
			0,0	97%	EU364886
			0,0	97%	EU364887
			0,0	96%	EU364888
		<i>M. hapla</i>	1e ⁻¹³⁵	87%	AY528416
	1e ⁻¹³⁴	92%	AY528417		
Proteína 14-3-3	14-3-3	<i>M. incognita</i>	0,0	98%	AF402309

*Análise realizada em 30/10/2008 no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov.

NSSE = nenhuma similaridade significativa encontrada

4.4. – Verificação da presença das cópias senso e antisenso dos genes no vetor pK7GWIWG2(I)

O sistema de clonagem Gateway[®], apesar de rápido, algumas vezes apresenta falhas. Para verificar a subclonagem das duas cópias, senso e antisenso, dos quatro fragmentos gênicos no vetor para RNAi pK7GWIWG2(I) e a orientação do íntron (5' → 3'), foi feita análise por digestão com endonucleases de restrição. Os vetores pk7IL (Fig. 15) e pk714-3-3 (Fig. 16) foram digeridos com as enzimas *Hind*III e *Xba*I e vetores pk7AQ (Fig. 17) e pk7HSP90 (Fig. 18) foram digeridos com *Sac*I e *Xba*I. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Para confirmação da subclonagem das duas cópias e da presença do íntron na posição 5' → 3' eram esperados dois fragmentos para cada gene: Isocitrato Liase 1.783 pb e 777 pb, proteína 14-3-3 2.120 pb e 1.114 pb, Arginina Quinase 2.328 pb e 1.189 pb, proteína de choque térmico 90 2.375 pb e 1.236 pb. Todos os vetores foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* e utilizados para transformação de *Nicotiana tabacum*.

4.5. – Análise do padrão de expressão gênica dos quatro genes-alvo por qRT-PCR

Primeiramente, foram realizadas ampliações em duplicata com diferentes diluições do cDNA de J2 (1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000) para gerar a curva padrão e determinar a eficiência de amplificação de cada gene (Fig. 19). Para a análise de expressão gênica é fundamental a determinação da eficiência de amplificação (PFAFFL, 2001), calculada pela seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$. Sendo que, o coeficiente angular, corresponde a inclinação da reta obtida por regressão linear dos valores de Ct em função do log das diluições de cDNA (curva padrão). Os dados gerados foram analisados pelo programa “Relative expression software tool” (REST) (PFAFFL *et al.*, 2002). A eficiência de amplificação é essencial para que a comparação da expressão relativa entre vários genes seja precisa e confiável.

Após obtidos os valores de eficiência para cada gene, foram montadas reações para comparação da expressão dos genes IL, AQ, 14-3-3 e HSP90 entre os estádios de ovo, J2 e fêmea, normalizados com os genes constitutivos 18S e β -actina. Os cDNAs utilizados estavam diluídos 100 vezes, e as reações foram feitas em triplicata (Fig. 20). Os valores de Ct foram determinados pelo programa do termociclador (Mastercycler ep realplex) e os dados foram inseridos no programa REST (PFAFFL *et*

al., 2002), resultando em comparação do nível de expressão de cada gene, de J2 em relação à ovo e de fêmea em relação à ovo, normalizado com 18S rRNA e o gene da β -actina.

O gene codificador de Isocitrato Liase mostrou uma expressão aproximadamente 100 vezes menor em J2 (**Fig. 21**), tanto em relação a ovo, quanto em relação à fêmea. Por ser um gene descrito na literatura envolvido na via de utilização de lipídeos para gerar energia, era esperado que ele fosse mais expresso na fase infectiva J2, que utiliza suas reservas de gordura para manutenção do metabolismo. No entanto, foi observada uma expressão consideravelmente bem menor em J2. Provavelmente, como o ovo passa por vários processos de ecdise, essas reservas lipídicas são importantes para que o nematóide possa se desenvolver normalmente dentro do ovo e, possivelmente, por essa razão esse gene apresentou um nível de expressão mais alto em ovo do que em J2.

O gene codificador de Arginina Quinase mostrou uma expressão cinco vezes maior em J2 e 10 vezes menor em fêmea (**Fig. 21**), ambos em relação a ovo. Esse resultado corrobora com o descrito na literatura, já que a enzima codificada por esse gene está envolvida na produção de energia (ATP) para contração muscular. O J2, por ser a forma infectiva, necessita da contração muscular para se locomover e invadir a raiz da planta hospedeira, já a fêmea que é parasita, após estabelecimento do sítio de alimentação permanece imóvel.

O gene da proteína 14-3-3 apresentou expressão consideravelmente igual nas três fases (**Fig. 21**). Por ser um gene codificador de uma chaperona multifuncional envolvida em diversos processos celulares, é esperado que ele seja expresso nos mesmos níveis, independente do estágio do nematóide.

Por último, o gene da proteína de choque térmico 90 apresentou a mesma expressão em J2 e ovo, mas foi 32 vezes menor em fêmea (**Fig. 21**). Por ser um gene ativado em períodos de estresse, é provável que seu nível de expressão seja menor em fêmea, que se encontra no sítio de alimentação na raiz da planta, e não passa por períodos de críticos de estresse.

A análise da expressão de genes por PCR em tempo real é uma técnica de fundamental importância, pois a partir dos resultados obtidos já é possível saber se o gene é um bom candidato ao silenciamento. Nesse caso, baseado nos dados obtidos pelo qRT-PCR, o gene codificador de Arginina Quinase pode ser considerado o melhor candidato, pois além de estar presente somente em invertebrados, ele é de

crucial para a movimentação do J2. Se o gene for silenciado, provavelmente o nematóide terá dificuldade de se locomover até a raiz e penetra-la. Conseqüentemente, se o J2 não infectar a planta hospedeira, não haverá diferenciação em fêmea parasita, fato que vai culminar na quebra do ciclo de vida.

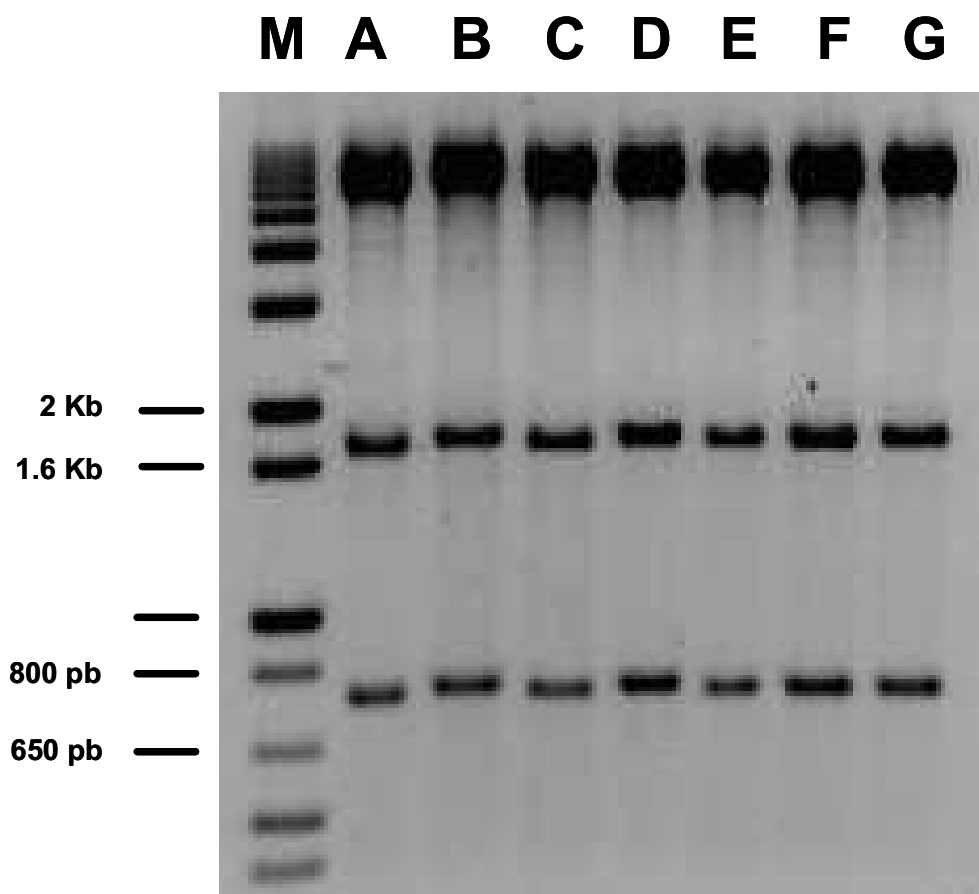


Figura 15. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7IL com *HindIII* e *XbaI*. Eletroforese em gel de agarose 1% dos clones contendo o vetor pK7IL (A a G). Todos apresentaram as duas bandas de tamanho esperado, 1.783 pb e 777 pb, confirmando a presença das cópias senso e antisenso do fragmento gênico de Isocitrato Liase e a orientação 5' → 3' do íntron. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™.

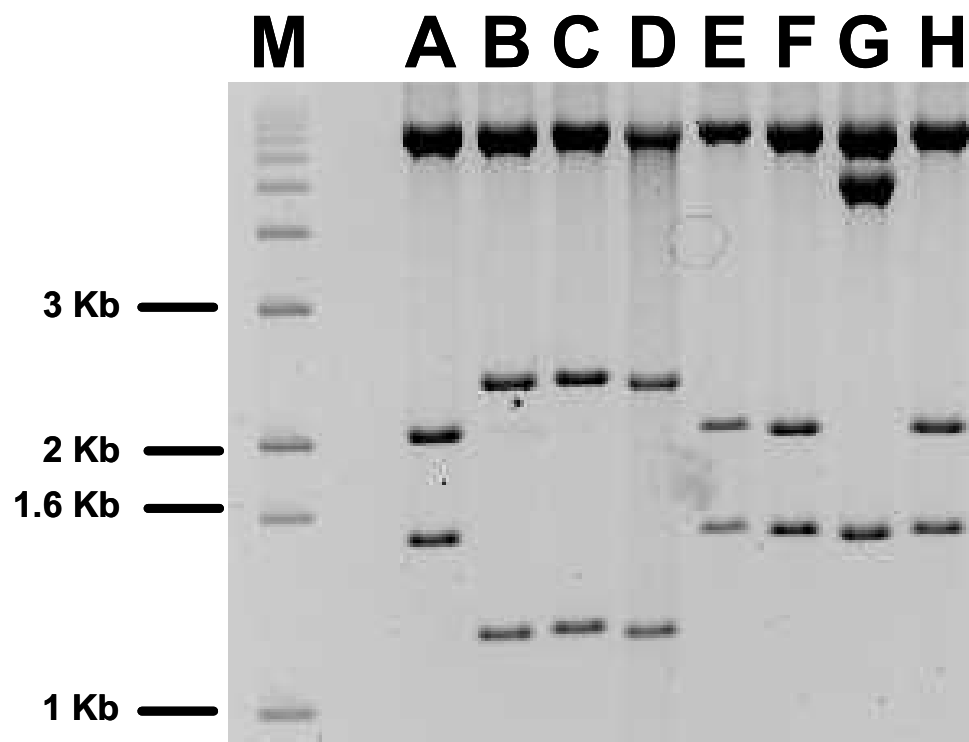


Figura 16. Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7AQ com *SacI* e *XbaI*. Eletroforese em gel de agarose 1% dos clones contendo o vetor pK7AQ (A a H). Os clones A, E, F e H apresentaram bandas do tamanho diferente do esperado, indicando a presença do íntron na posição invertida ($3' \rightarrow 5'$). Os clones B, C, D apresentaram as duas bandas de tamanho esperado, 2.328 pb e 1.189 pb, confirmando a presença das cópias senso e antisense do fragmento gênico de Arginina Quinase e a orientação $5' \rightarrow 3'$ do íntron. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da InvitrogenTM.

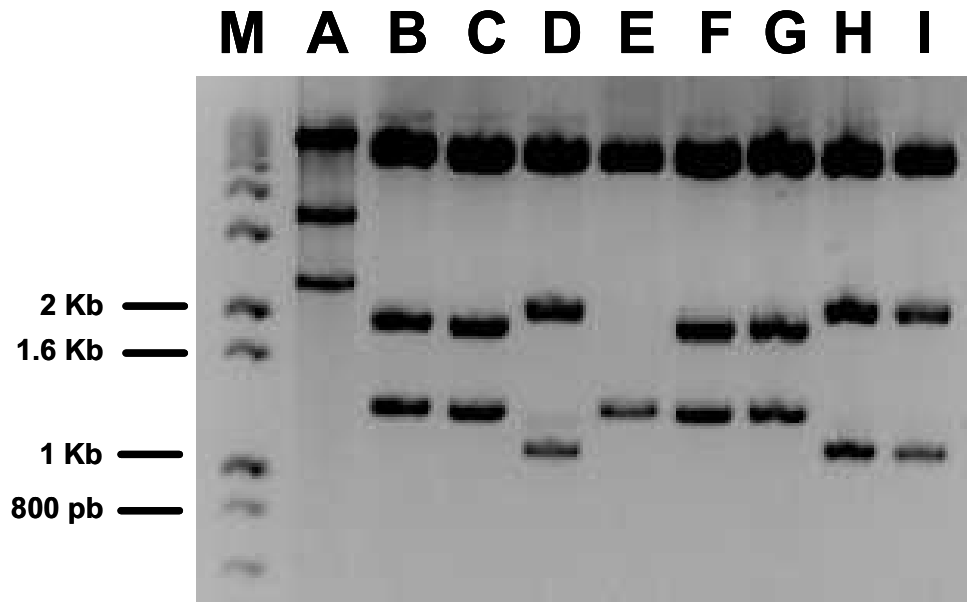


Figura 17. **Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK714-3-3 com *HindIII* e *XbaI*.** Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão dos clones contendo o vetor pK7GWIWG2(I) não recombinado (A) e pK714-3-3 (B a I). Os clones B, C, F e G apresentaram bandas do tamanho diferente do esperado, indicando a presença do íntron na posição invertida ($3' \rightarrow 5'$). Os clones D, H, I apresentaram as duas bandas de tamanho esperado, 2.120 pb e 1.114 pb, confirmando a presença das cópias senso e antisense do fragmento gênico de 14-3-3 e a orientação $5' \rightarrow 3'$ do íntron. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™.

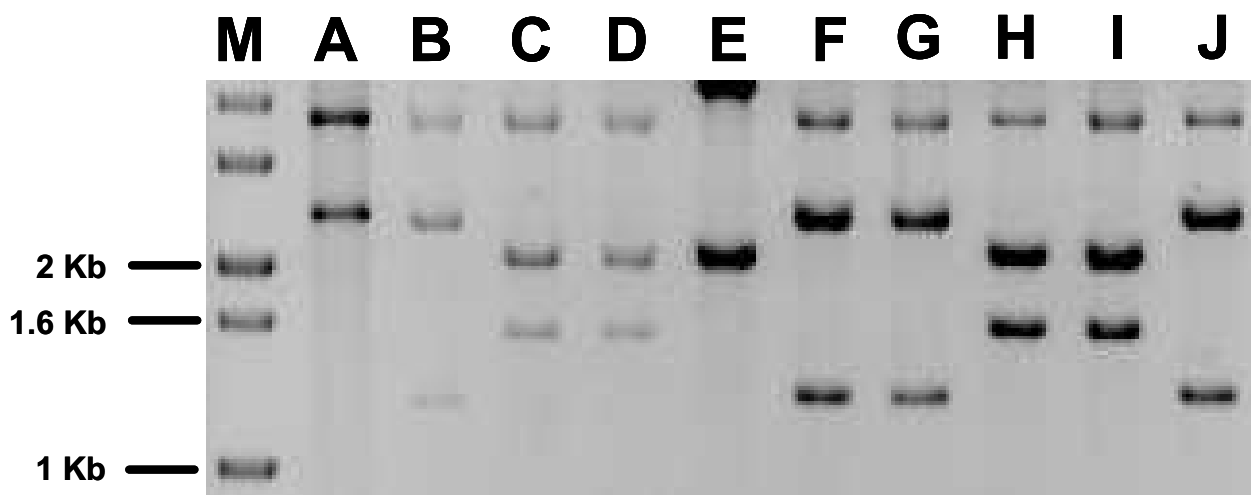


Figura 18. **Digestão do DNA plasmidial dos clones contendo o vetor pK7HSP90 com *SacI* e *XbaI*.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos clones contendo o vetor pK7HSP90 (A a H). Os clones A, E, F e H apresentaram bandas do tamanho diferente do esperado, indicando a presença do íntron na posição invertida ($3' \rightarrow 5'$). Os clones B, C, D apresentaram as duas bandas de tamanho esperado, 2.375 pb e 1.236 pb, confirmando a presença das cópias senso e antisenso do fragmento gênico de HSP90 e a orientação $5' \rightarrow 3'$ do íntron. O clone E apresentou padrão fora do esperado e foi descartado. (M) Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus da Invitrogen™.

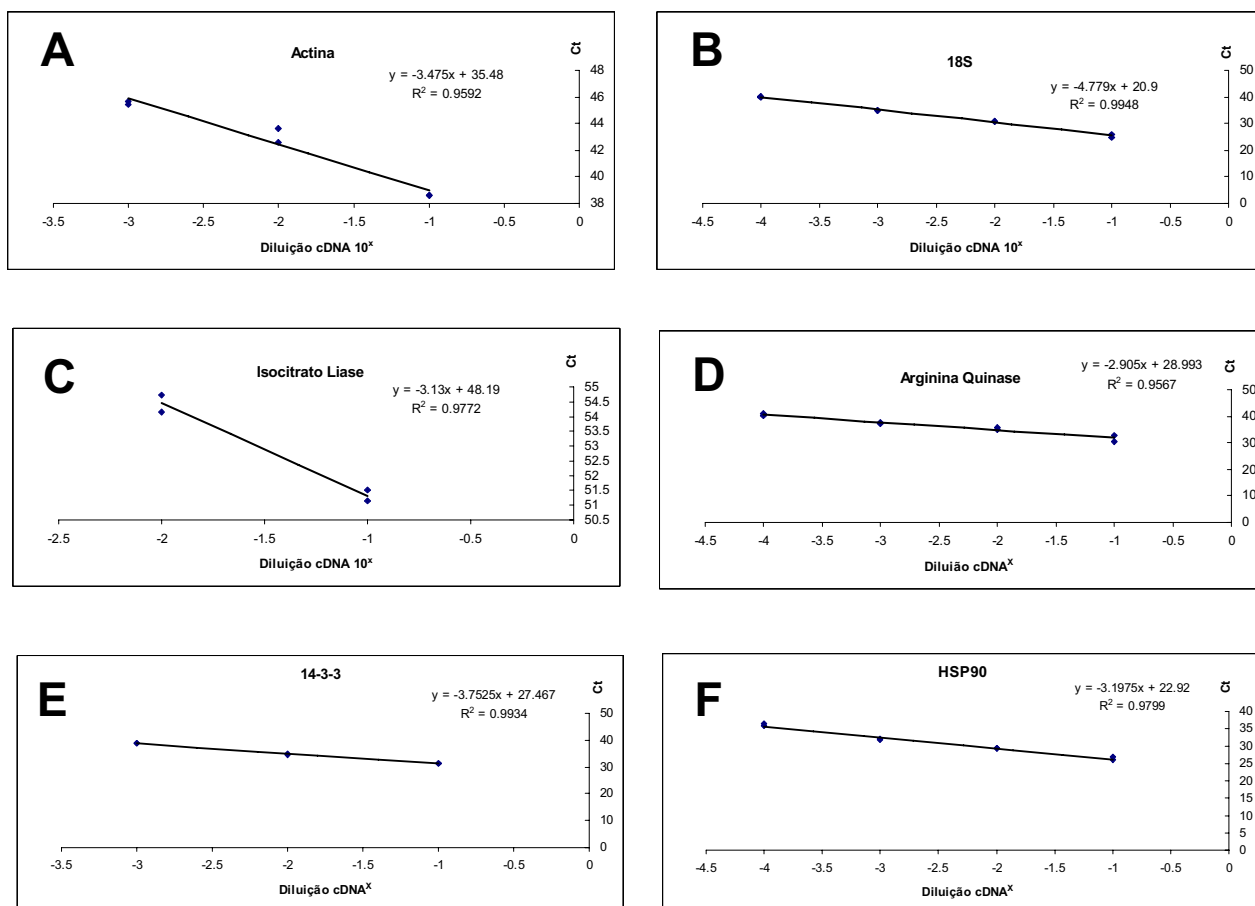


Figura 19. **Curvas-padrão de amplificação para cálculo de eficiência.** Amplificações em duplicata com diferentes diluições do cDNA de J2 (1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000) foram realizadas para gerar a curva padrão (regressão linear dos valores de Ct em função do log das diluições de cDNA) e assim determinar a eficiência de amplificação de cada gene, calculada pela fórmula: $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$. (A) Eficiência de amplificação de 1,9 para β -actina; (B) 1,6 para 18S rRNA; (C) 2,0 para Isocitrato Liase; (D) 2,2 para Arginina Quinase; (E) 1,8 para proteína 14-3-3; e (F) 2,0 para proteína HSP90.

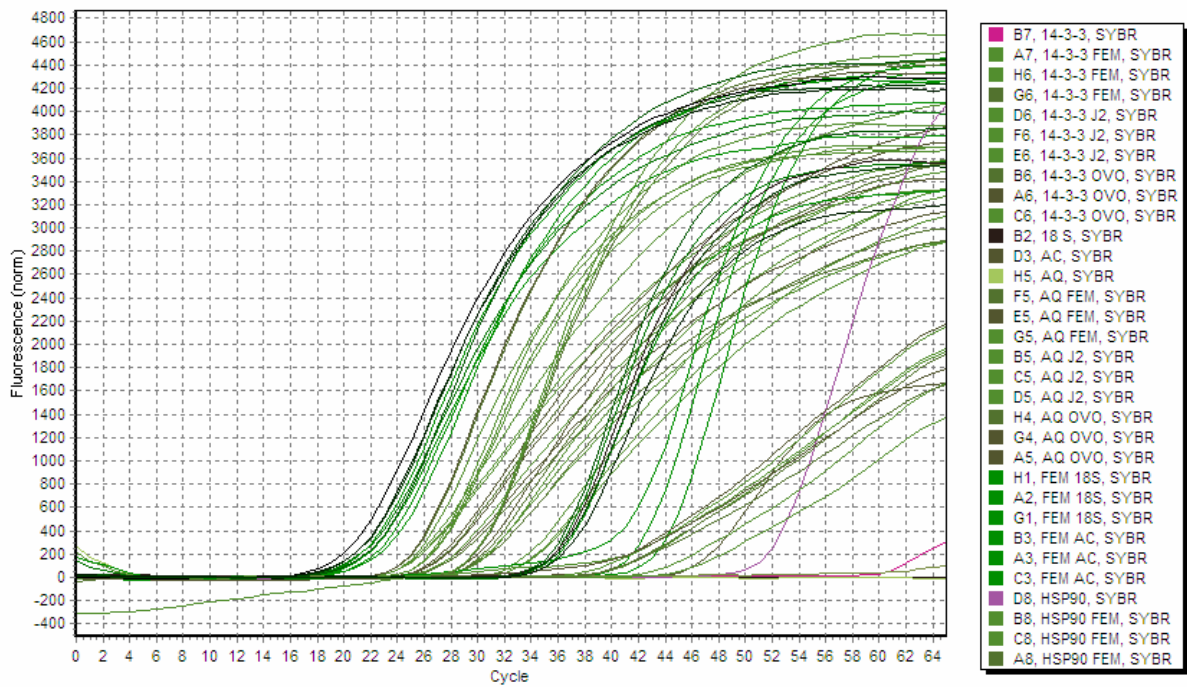


Figura 20. Curvas de monitoramento da eficiência que ilustram a amplificação em tempo real. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um limiar de detecção, igual para cada conjunto de oligonucleotídeos/amostras testado e, por convenção, denominado de Ct. Para cada conjunto de oligonucleotídeos os testes foram realizados em triplicata com cDNA de ovo, J2 e fêmea.

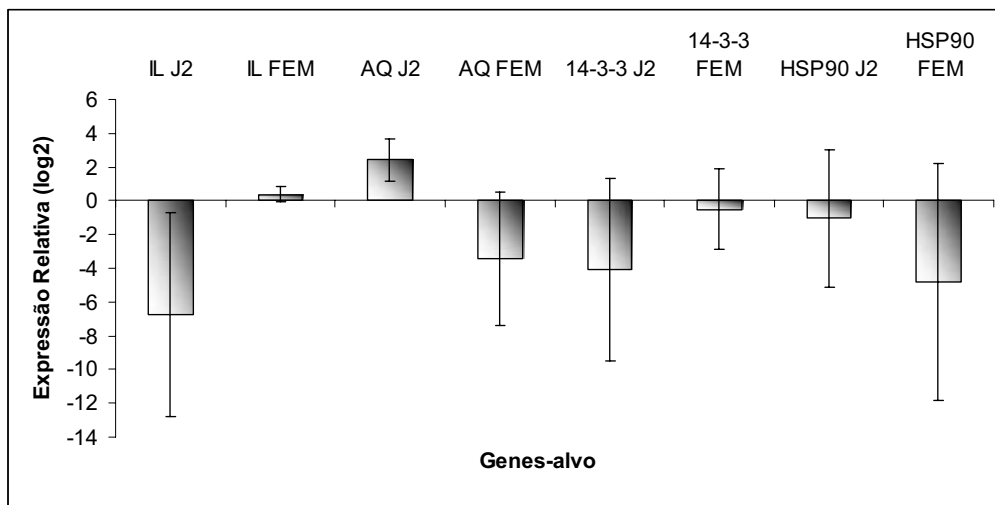


Figura 21. Gráfico em barras da expressão diferencial de genes. Para cada gene-alvo a amplificação foi feita em triplicata, utilizando cDNA de ovo, J2 e fêmea. A análise resultou em comparação do nível de expressão dos genes, de J2 e fêmea em relação à ovo, normalizado com os genes 18S rRNA e β -actina.

4.6. – Transformação de plantas modelo para avaliar a indução de resistência a *Meloidogyne incognita*

Algumas plantas de tabaco já estão na fase de transformação e regeneração. Para cada fragmento gênico foi realizada co-cultura de 100 fragmentos foliares com *Agrobacterium tumefaciens*. Adicionalmente, foram feitos 3 controles experimentais distintos (**Tab. 2**).

Tabela 2. Composição dos meios para os três controles experimentais.

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

No controle 1, foi observado que os fragmentos foliares se regeneraram rapidamente, dando origem a inúmeros brotos (**Fig. 22A**), confirmando a eficiência do hormônio de indução de brotos BAP. No controle 2, observou-se que não houve crescimento de nenhuma agrobactéria remanescente, comprovando a eficiência do antibiótico cefotaxima (**Fig. 22B**). No controle 3, os fragmentos foliares que não foram co-cultivados com agrobactéria ficaram brancos, o que confirma a eficiência do antibiótico canamicina na eliminação de células não transformadas (**Fig. 22C**). As transformações com os quatro genes-alvo estão em andamento. As possíveis plantas transformadas com os genes Isocitrato Liase, Arginina Quinase, proteína 14-3-3 e proteína de choque térmico HSP90 começaram a apresentar formação de brotos foliares (**Fig. 22D,E, F e G**). Assim que esses brotos atingirem um tamanho maior, serão transferidos para magentas contendo meio MS acrescido de 0,1 mg/L do hormônio ácido naftaleno acético (ANA) para indução de enraizamento.

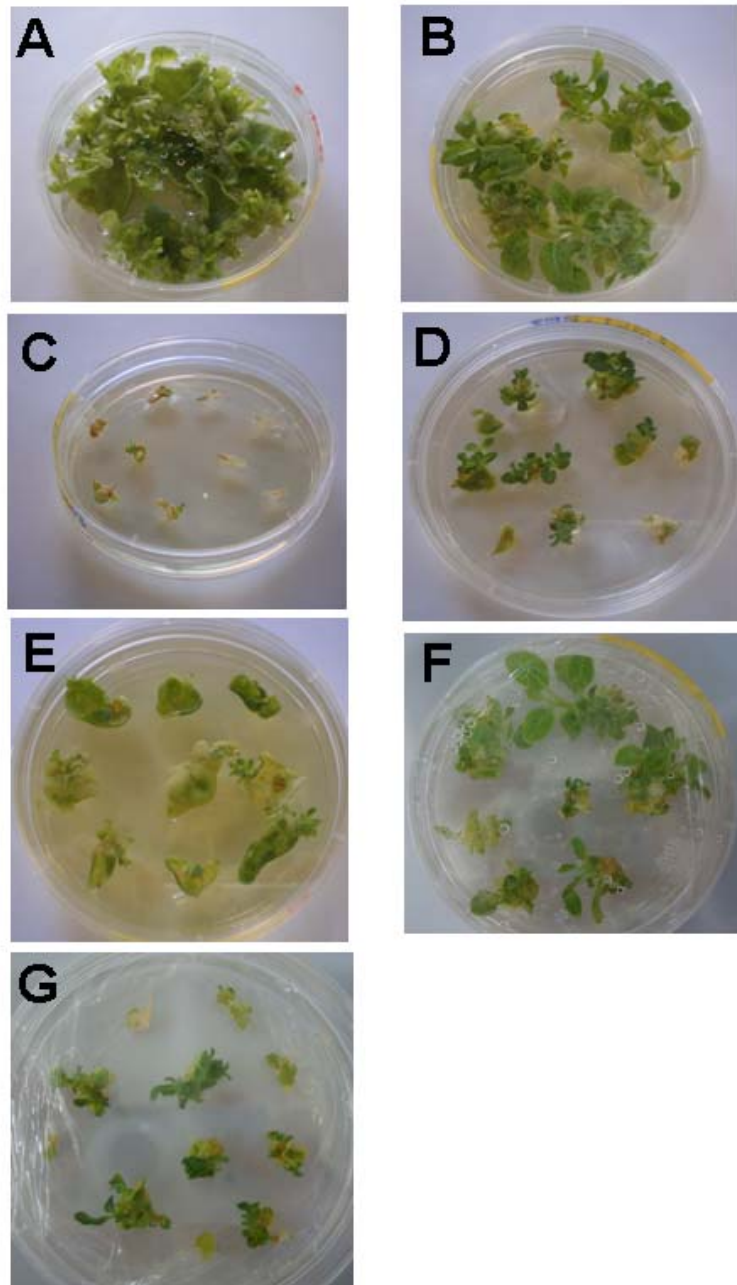


Figura 22. **Explantos de *Nicotiana tabacum* em placas para cultura de tecidos.** (A) Fragmentos foliares não transformados para testar a eficiência do hormônio de indução de brotos BAP (6-benzilaminopurina). (B) Fragmentos foliares transformados via agrobactéria para avaliar a eficiência do antibiótico cefotaxima. (C) Fragmentos foliares não transformados para avaliar a eficiência da seleção pelo antibiótico canamicina. (D,E,F e G) Fragmentos foliares transformados com os genes Isocitrato Liase, Arginina Kinase, 14-3-3 e HSP 90 respectivamente, apresentando formação de brotos.

5 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho quatro fragmentos gênicos foram selecionados, isolados e subclonados para uso no silenciamento gênico de *Meloidogyne incognita*. Adicionalmente, foi feita a comparação do padrão de expressão dos quatro genes-alvo em ovo, J2 e fêmea, que mostrou diferença significativa de expressão gênica. Como a próxima etapa desse trabalho é validar funcionalmente os genes selecionados utilizando a técnica de RNA interferente, esses resultados são cruciais para comparação e análise do grau de silenciamento gênico que serão obtidos nos bioensaios *in planta*.

A próxima etapa desse trabalho é então analisar por meio de expressão de RNAi *in planta* se os genes selecionados são cruciais para o estabelecimento e manutenção do parasitismo do nematóide. Após feita a validação em plantas modelo, esses genes serão utilizados para transformação de plantas de interesse agrônômico, como algodão, cana-de-açúcar, café e soja. Considerando que o genoma de *M. incognita* foi recentemente publicado (ABAD *et al.*, 2008), existe um grande número de genes conhecidos que deverão ser validado funcionalmente por silenciamento gênico. Caso essa estratégia funcione, poderia ser gerada uma alternativa eficiente para controle ou minimização dos problemas gerados pelos fitonematóides na agricultura mundial.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N. e CASTAGNONE-SERENO, P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology** 4(4): 217-224.
- ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V. C.; CAILLAUD, M. C.; COUTINHO, P. M.; DASILVA, C.; DE LUCA, F.; DEAU, F.; ESQUIBET, M.; FLUTRE, T.; GOLDSTONE, J. V.; HAMAMOUCHE, N.; HEWEZI, T.; JAILLON, O.; JUBIN, C.; LEONETTI, P.; MAGLIANO, M.; MAIER, T. R.; MARKOV, G. V.; MCVEIGH, P.; PESOLE, G.; POULAIN, J.; ROBINSON-RECHAVI, M.; SALLET, E.; SEGURENS, B.; STEINBACH, D.; TYTGAT, T.; UGARTE, E.; VAN GHELDER, C.; VERONICO, P.; BAUM, T. J.; BLAXTER, M.; BLEVEZACHEO, T.; DAVIS, E. L.; EWBANK, J. J.; FAVERY, B.; GRENIER, E.; HENRISSAT, B.; JONES, J. T.; LAUDET, V.; MAULE, A. G.; QUESNEVILLE, H.; ROSSO, M. N.; SCHIEX, T.; SMANT, G.; WEISSENBACH, J. e WINCKER, P. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology** 26(8): 909-15.
- ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E. e MCPHERSON, M. J. (2003). Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review of Phytopathology** 41: 615-39.
- BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.; ATKINSON, H. J. e MCPHERSON, M. J. (2005a). RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 18(10): 1099-1106.
- BAKHETIA, M.; CHARLTON, W. L.; URWIN, P. E.; MCPHERSON, M. J. e ATKINSON, H. J. (2005b). RNA interference and plant parasitic nematodes. **Trends in Plant Science** 10(8): 362-367.
- BAKHETIA, M.; URWIN, P. E. e ATKINSON, H. J. (2007). qPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 20(3).

- BERDICHEVSKY, A. e GUARENTE, L. (2006). A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins. **Cell Cycle** 5(22): 2588-91.
- BERDICHEVSKY, A.; VISWANATHAN, M.; HORVITZ, H. R. e GUARENTE, L. (2006). *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. **Cell** 125(6): 1165-77.
- BIRD, D. M. e KALOSHIAN, I. (2003). Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 62(2): 115-123.
- BIRNBY, D. A.; LINK, E. M.; VOWELS, J. J.; TIAN, H.; COLACURCIO, P. L. e THOMAS, J. H. (2000). A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** 155(1): 85-104.
- BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O.; MENDES, E. A. e ARAGAO, F. J. (2007). RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interaction** 20(6): 717-26.
- CAILLAUD, M. C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. e FAVERY, B. (2008). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology** 165(1): 104-13.
- CHEN, Q.; REHMAN, S.; SMANT, G. e JONES, J. T. (2005). Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 18(7): 621-625.
- CHITWOOD, D. J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. **Pest Management Science** 59(6-7): 748-753.
- CSERMELY, P.; SCHNAIDER, T.; SOTI, C.; PROHASZKA, Z. e NARDAI, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacology and Therapeutics** 79(2): 129-68.
- DAVULURI, G. R.; VAN TUINEN, A.; FRASER, P. D.; MANFREDONIA, A.; NEWMAN, R.; BURGESS, D.; BRUMMELL, D. A.; KING, S. R.; PALYS, J.; UHLIG, J.; BRAMLEY, P. M.; PENNING, H. M. e BOWLER, C. (2005). Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. **Nature Biotechnology** 23(7): 890-5.

- DEVANEY, E.; O'NEILL, K.; HARNETT, W.; WHITESELL, L. e KINNAIRD, J. H. (2005). Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. **International Journal of Parasitology** 35(6): 627-36.
- EHWAETI, M. E.; FARGETTE, M.; PHILLIPS, M. S. e TRUDGILL, D. L. (1999). Host status differences and their relevance to damage by *Meloidogyne incognita*. **Nematology** 1: 421-32.
- FAIRBAIRN, D. J.; CAVALLARO, A. S.; BERNARD, M.; MAHALINGA-IYER, J.; GRAHAM, M. W. e BOTELLA, J. R. (2007). Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. **Planta** 226(6): 1525-33.
- FANELLI, E.; DI VITO, M.; JONES, J. T. e DE GIORGI, C. (2005). Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. **Gene** 349: 87-95.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. e MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 391: 806-811.
- GHEYSEN, G. e FENOLL, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology** 40: 191-219.
- GHEYSEN, G. e VANHOLME, B. (2007). RNAi from plants to nematodes. **Trends in Biotechnology** 25(3): 89-92.
- GORDON, K. H. e WATERHOUSE, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology** 25(11): 1231-2.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings Natl Acad Sci U S A** 103(39): 14302-6.
- HUANG, G.; DONG, R.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. (2005). Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes. **International Journal for Parasitology** 35(6): 685-692.
- INOUE, T.; HIRATA, K.; KUWANA, Y.; FUJITA, M.; MIWA, J.; ROY, R. e YAMAGUCHI, Y. (2006). Cell cycle control by daf-21/Hsp90 at the first meiotic prophase/metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. **Development, Growth and Differentiation** 48(1): 25-32.

- INOUE, T.; TAKAMURA, K.; YAMAE, H.; ISE, N.; KAWAKAMI, M.; TABUSE, Y.; MIWA, J. e YAMAGUCHI, Y. (2003). *Caenorhabditis elegans* DAF-21 (HSP90) is characteristically and predominantly expressed in germline cells: spatial and temporal analysis. **Development, Growth and Differentiation** 45(4): 369-76.
- JAUBERT, S.; LAFFAIRE, J. B.; LEDGER, T. N.; ESCOUBAS, P.; AMRI, E. Z.; ABAD, P. e ROSSO, M. N. (2004). Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **International Journal for Parasitology** 34(7): 873-880.
- JEPSON, B. S. (1987). Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). **Wallingford, UK, CAB Int.**
- JEYARATNAM, J. (1990). Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World Health Stat Q** 43(3): 139-44.
- JIN, Y. H.; KIM, Y. J.; KIM, D. W.; BAEK, K. H.; KANG, B. Y.; YEO, C. Y. e LEE, K. Y. (2008). Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. **Biochemistry Biophysics Research Communication** 368(3): 690-5.
- JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D.; ENGLISH, J.; QUE, Q. e NAPOLI, C. A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology** 31(5): 957-73.
- KIMBER, M. J.; MCKINNEY, S.; MCMASTER, S.; DAY, T. A.; FLEMING, C. C. e MAULE, A. G. (2007). flp gene disruption in a parasitic nematode reveals motor dysfunction and unusual neuronal sensitivity to RNA interference. **The FASEB Journal** 21: 1233-1243.
- LANG, A. B.; WYSS, C. e EPPENBERGER, H. M. (1980). Localization of arginine kinase in muscles fibres of *Drosophila melanogaster*. **Journal of muscle research and cell motility** 1(2): 147-61.
- LILLEY, C. J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W. L. e URWIN, P. E. (2007). Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology** 8(5): 701-711.
- LILLEY, C. J.; GOODCHILD, S. A.; ATKINSON, H. J. e URWIN, P. E. (2005). Cloning and characterisation of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA. **Internacional Journal of Parasitology** 35(14): 1577-85.

- MATTHEWS, B. F.; MACDONALD M. H.; THAI V. K. e L., T. M. (2003). Molecular Characterization of Arginine Kinases in the Soybean Cyst (*Heterodera glycines*). **Journal of Nematology** 35(3): 252-258.
- MCCARTER, J. P.; MITREVA, M. D.; MARTIN, J.; DANTE, M.; WYLIE, T.; RAO, U.; PAPE, D.; BOWERS, Y.; THEISING, B.; MURPHY, C. V.; KLOEK, A. P.; CHIAPELLI, B. J.; CLIFTON, S. W.; BIRD, D. M. e WATERSTON, R. H. (2003). Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. **Genome Biology** 4(4): R26.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- OGITA, S.; UEFUJI, H.; MORIMOTO, M. e SANO, H. (2004). Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. **Plant Molecular Biology** 54(6): 931-41.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29(9): e45.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W. e DEMPFLER, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research** 30(9): e36.
- PIANO, F.; SCHETTER, A. J.; MANGONE, M.; STEIN, L. e KEMPHUES, K. J. (2000). RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology** 10(24): 1619-22.
- PLATZER, E. G.; WANG, W.; THOMPSON, S. N. e BORCHARDT, D. B. (1999). Arginine kinase and phosphoarginine, a functional phosphagen, in the rhabditoid nematode *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Parasitology** 85(4): 603-607.
- RIBEIRO, S. G.; LOHUIS, H.; GOLDBACH, R. e PRINS, M. (2007). Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. **Journal of Virology** 81(4): 1563-73.
- RIDDLE, D. L. (1999). Ageing. A message from the gonads. **Nature** 399(6734): 308-9.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- SASSER, J. N. (1980). Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease** 64: 36-41.
- SASSER, J. N.; EISENBACK, J. D. e CARTER, C. C. (1983). The international *Meloidogyne* project - its goals and achievements. **Annual Review of Phytopathology** 21: 271-288.
- SHINGLES, J.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J. e URWIN, P. E. (2007). *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. **Experimental Parasitology** 115(2): 114-120.
- SILES-LUCAS MDEL, M. e GOTTSSTEIN, B. (2003). The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. **Trends in Parasitology** 19(12): 575-81.
- STEEVES, R. M.; TODD, T. C.; ESSIG, J. S. e TRICK, H. N. (2006). Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. **Functional Plant Biology** 33: 991-999.
- TRUDGILL, D. L. (1995). Origins of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp. Nematoda) in relation to their cultural control. **Phytoparasitica** 23: 191-194.
- TRUDGILL, D. L. e BLOK, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 39: 53-77.
- TYAGI, H.; RAJASUBRAMANIAM, S.; RAJAM, M. V. e DASGUPTA, I. (2008). RNA-interference in rice against Rice tungro bacilliform virus results in its decreased accumulation in inoculated rice plants. **Transgenic Research**.
- URWIN, P. E.; LILLEY, C. J. e ATKINSON, H. J. (2002). Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 15(8): 747-752.
- VAN DER EYCKEN, W.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M. e GHEYSEN, G. (1996). A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. **Plant Journal** 9(1): 45-54.
- VASTENHOUW, N. L.; BRUNSCHWIG, K.; OKIHARA, K. L.; MULLER, F.; TIJSTERMAN, M. e PLASTERK, R. H. (2006). Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. **Nature** 442(7105): 882.
- VOINNET, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends Genet** 17(8): 449-59.

- WATERHOUSE, P. M.; WANG, M. B. e LOUGH, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature** 411(6839): 834-42.
- WILLIAMSON, V. M. e GLEASON, C. A. (2003). Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 6(4): 327-333.
- WILLIAMSON, V. M. e HUSSEY, R. S. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell** 8(10): 1735-45.
- WILLIAMSON, V. M. e KUMAR, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics** 22(7): 396-403.
- WINSTON, W. M.; MOLODOWITCH, C. e HUNTER, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science** 295(5564): 2456-9.
- YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K. e SUBRAMANIAM, K. (2006). Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. **Molecular Biochemistry Parasitology** 148(2): 219-22.
- ZHU, Q.; ARAKANE, Y.; BEEMAN, R. W.; KRAMER, K. J. e MUTHUKRISHNAN, S. (2008). Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(18): 6650-5.

ANEXOS

Nome dos oligonucleotídeos	Seqüência	T _m °C
IsocitratoLiaseSenso	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGGTAAGT ATAATCTCCCCGA3'	86,9
IsocitratoLiaseAntiSenso	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGCGGGTT CTATTTAACAAC3'	87,3
ArgininaQuinaseSenso	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTCAAGA AGTACTTCACGAA3'	86,0
ArgininaQuinaseAntisenso	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATCAAA CGCTCAAGCAGG3'	89,5
HSP90Senso	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCCAGTT GATGTCCTTGATCATCAACACG3'	87,7
HSP90Antisenso	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTCACCG TCATTCTTGTC3'	87,7
14-3-3Senso	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCGTTAT GATGACATGGC3'	87,1
14-3-3Antisenso	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAGTTGC ATAATAAGAGTCG3'	86,9
SP6	5'GATTTAGGTGACACTATAG3'	51,0
T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'	47,0
M13Senso	5'GTAACACGACGGCCAG3'	52,0
M13Antisenso	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	47,0
MiIsocitratoLiaseSenso	5'ATCCAATTCCTTGGAGAGG3'	60,0
MiIsocitratoLiaseAntisenso	5'ACTGCACCAAAGGGTCGTTA3'	60,0
MiArgininaQuinaseSenso	5'TGGAGGGAATGACCAAAGAG3'	60,0
MiArgininaQuinaseAntisenso	5'ATTGCCTCCGTTTTGCATAG3'	60,0
Mi14-3-3Senso	5'TGAGGAGCGCAATCTTCTCT3'	60,0
Mi14-3-3Antisenso	5'GCAAATGTCACGCAATTCAC3'	60,0
MiHSP90Senso	5'ATCCGTAAGTGCCTGATCC3'	60,0
MiHSP90nAntisenso	5'CATCCTCAGCCTCATCATCA3'	60,0
Mi18SSenso	5'ACTTGACGGGAGCATAATCG3'	60,0
Mi18SAntisenso	5'CGGCCTCAAAGAGAACAGTC3'	60,0
MiActinaSenso	5'CACGGTATCGTCACCAACTG3'	60,0
MiActinaAntisenso	5'TACAATGAGAGCACGGCTTG3'	60,0

