



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

USO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS

Roberta Ramos Coelho

Brasília – DF
Agosto de 2013

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

**USO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O
CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

Roberta Ramos Coelho

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

Co-Orientadora: Dra. Janice de Almeida Engler

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília – DF, Agosto DE 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ Departamento de Biologia Celular
– UnB

Prof. Dra. Zila Luz Paulino Simões

Universidade de São Paulo - USP

Dra. Maria Cristina Mattar da Silva

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso

Embrapa Cerrados

Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)

Embrapa Cenargen/ Departamento de Biologia Celular – UnB

Profa. Dra. Janice de Almeida Engler (Co-orientadora)

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Sophia Antipolis, França

Dr. Leonardo Lima Pepino de Macedo (Suplente)

Pós-doc Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília – DF, Agosto de 2013

Ao meu amado esposo, Dijair Júnior, que além de ser meu companheiro na vida, é um grande parceiro no trabalho. Não tenho palavras para descrever o quanto o amo e admiro.

DEDICO.

À Deus, o autor da minha vida, razão de todo meu trabalho e motivação para caminhar.

Minha rocha e fortaleza.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche na França.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Biologia Celular, pela oportunidade de realização do curso.

À minha orientadora, Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, por todo respeito, ensinamentos e amizade compartilhados durante estes anos.

À Dra. Janice de Almeida Engler, que além de ter me orientado durante o Doutorado Sanduíche realizado no Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), tornou-se uma grande amiga por quem tenho grande admiração e respeito.

Ao Dr. Gilbert Engler, pelo bom-humor belga-brasileiro, e pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos fiz na França, especialmente Natália Rodiuc, a russa mais engraçada do mundo; Cristina Martin, grande amiga de quem consegui lágrimas e um abraço de despedida (sim, me sinto especial por isto); e Lydia Thon, a francesa mais legal que existe!

Aos amigos Alexandre Firmino, Ariane Lacerda, Caroline Bezerra, Fernando Fonseca, Itamara Mezzalira, Leonardo Pepino, Raquel Sampaio e Wagner Lucena, pela amizade sincera e apoio nos momentos difíceis e paciência nos meus ataques de chatice, que não foram poucos.

À todos os demais colegas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, pela colaboração e parceria nestes quatro anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Walter Terra, da USP, pelo auxílio na aprendizagem da técnica de microinjeção, que me fez economizar um tempo precioso durante a execução do trabalho.

Aos meus pais, Gustavo Torres Coelho e Márcia Roberta R. Coelho, por terem me ensinado o que é integridade e perseverança. Eu os amo muito!!

À minha amada irmã, Gabriela Ramos Coelho, que se tornou minha melhor amiga desde que saí de casa (risos).

À todos os colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, meus agradecimentos pelas experiências compartilhadas e vividas ao longo do curso.

*“Se você enxergar o que está por trás de todas
as coisas sem exceção, então tudo se tornará
transparente pra você. Mas um mundo completamente
transparente é um mundo invisível.”*

C. S. Lewis

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvii
ABREVIATURAS	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
I – INTRODUÇÃO	
I.i. Introdução geral	1
I.ii. O bicudo-do-algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>)	2
I.iii. Reprodução dos insetos – regulação hormonal da oogênese e vitelogênese	5
a. Anatomia geral e origem dos órgãos reprodutivos femininos	6
b. Regulação hormonal da reprodução e vitelogênese	8
I.iv. Desenvolvimento embrionário	15
I.v. O uso de RNA interferente (RNAi) no estudo de genômica funcional	18
I.vi. Nematóide de galhas <i>Meloidogyne incognita</i>	23
I.vii. Ciclo celular de plantas	25
I.viii. Ciclo de endoreduplicação	27
I.ix. Proteínas inibidoras de ciclina quinase – ICK/KRPs	28
I.x. Referências	29
II – HIPÓTESE	42
III – JUSTIFICATIVA	42
IV – OBJETIVO GERAL	43

V – CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1: Seleção de genes referência para normalização da PCR quantitativa em estudos de expressão gênica de diferentes tecidos de *Anthonomus grandis*

RESUMO	45
1.1. INTRODUÇÃO	46
1.2. OBJETIVOS	48
1.3. MATERIAL E MÉTODOS	48
1.3.1. Coleta das amostras – dissecação de larvas e adultos de <i>A. grandis</i>	48
1.3.2. Seleção das sequências gênicas e desenho dos <i>primers</i>	52
1.3.3. Isolamento do RNA total e síntese de cDNA	53
1.3.4. Ensaio de qRT-PCR	54
1.4. RESULTADOS	55
1.4.1. Seleção dos candidatos a gene referência	55
1.4.2. Níveis de expressão dos genes candidatos à referência	58
1.4.3. Análise de estabilidade de expressão usando o Bestkeeper	58
1.4.4. Análise de estabilidade de expressão usando o geNorm	61
1.4.5. Análise de estabilidade de expressão usando o NormFinder	65
1.4.6. Análise de estabilidade combinada das medidas produzidas pelo geNorm, NormFinder e Bestkeeper	68
1.5. DISCUSSÃO	69
1.6. CONCLUSÕES	72

1.7. REFERÊNCIAS	72
-------------------------	-----------

CAPÍTULO 2: Efeitos do silenciamento gênico da vitelogenina na reprodução de *Anthonomus grandis*

RESUMO	79
---------------	-----------

2.1. INTRODUÇÃO	80
------------------------	-----------

2.2. OBJETIVOS	82
-----------------------	-----------

2.3. MATERIAL E MÉTODOS	82
--------------------------------	-----------

2.3.1. Insetos	82
----------------	-----------

2.3.2. Determinação do número de instares de <i>A. grandis</i>	82
--	-----------

2.3.3. Quantificação relativa do nível do transcrito de Vitelogenina durante o desenvolvimento de <i>A. grandis</i>	83
---	-----------

2.3.4. Citolocalização da proteína Vitelogenina em fêmeas de <i>A. grandis</i>	85
--	-----------

2.3.5. Seleção do fragmento de DNA que codifica o gene da vitelogenina e clonagem em vetor plasmidial	86
---	-----------

2.3.6. Produção de dsRNA da vitelogenina <i>in vitro</i>	87
--	-----------

2.3.7. Silenciamento gênico da vitelogenina em fêmeas de <i>A. grandis</i>	88
--	-----------

2.3.8. Avaliação molecular do silenciamento gênico	91
--	-----------

2.3.9. Avaliação histológica dos ovos produzidos por fêmeas de <i>A. grandis</i> microinjetadas com dsVtg	91
---	-----------

2.4. RESULTADOS	92
------------------------	-----------

2.4.1. Determinação do número de instares de <i>A. grandis</i>	92
--	-----------

2.4.2. Quantificação relativa do nível do transcrito da vitelogenina no desenvolvimento de <i>A. grandis</i>	92
2.4.3. Citolocalização da proteína Vitelogenina em fêmeas de <i>A. grandis</i>	95
2.4.4. Avaliação do silenciamento gênico – efeito da microinjeção de dsRNA da vitelogenina na expressão gênica e na biologia de <i>A. grandis</i>	97
2.4.5. Avaliação histológica dos ovos depositados por fêmeas submetidas ao silenciamento gênico da vitelogenina	102
2.5. DISCUSSÃO	105
2.6. CONCLUSÕES	110
2.7. REFERÊNCIAS	110

CAPÍTULO 3: On the track of unraveling the function of KRP cell cycle inhibitors during root-knot nematode feeding site development. (Trabalho desenvolvido em paralelo durante o estágio de doutorado no exterior)

INTRODUÇÃO	115
3.1. SUMMARY	118
3.2. INTRODUCTION	118
3.3. MATERIAL AND METHODS	121
3.3.1. Plant growth and transformations	121
3.3.2. GUS histochemical analysis and microscopy	122
3.3.3. RT-PCR analyses of transgenic versus wild-type lines	122
3.3.4. Morphological analysis of gall tissues	122

3.3.5. Surface dimensions of giant cells in the <i>KRP3OE</i> line	123
3.3.6. Flow cytometry analyses of infected and gall less roots	123
3.3.7. KRP protein localization during cell division and nematode feeding site development	124
3.3.8. Nematode infection tests and acid fuchsin staining	125
3.3.9. Whole-mount analysis of propidium iodide stained and cleared infected roots	125
3.4. RESULTS	125
3.4.1. GUS promoter activity of <i>KRP3</i> , <i>KRP5</i> and <i>KRP7</i> genes in galls	125
3.4.2. Loss of <i>KRP</i> function induces mitosis in galls affecting nematode reproduction	126
3.4.3. Overexpression of <i>KRP3</i> , <i>KRP5</i> and <i>KRP7</i> differentially affects gall development	127
3.4.4. Ectopic <i>KRP3</i> expression induces changes in nuclei shape and ploidy levels in giant cells	128
3.4.5. <i>KRP3</i> and <i>KRP5</i> co-localize with chromosomes during mitosis, while <i>KRP7</i> seems to be degraded during mitosis	128
3.4.6. Ectopic expression of <i>KRP</i> impairs nematode maturation and reduces offspring	129
3.5. DISCUSSION	130
3.5.1. <i>KRP3</i> , <i>KRP5</i> and <i>KRP7</i> are differently expressed in galls	130
3.5.2. <i>KRP</i> loss-of-function leads to onset of cell wall stubs in giant cells and provokes mitosis in surrounding cells	131

3.5.3. Ectopic <i>KRP3</i> expression influences giant cell and nuclei shape gall and affects ploidy levels in feeding sites	132
3.6. CONCLUDING REMARKS	134
3.7. ACKNOWLEDGMENTS	135
3.8. REFERENCES	135
3.9. SUPPORTING INFORMATION	138
3.10. FIGURES LEGEND	139
3.11. FIGURES	141
4. ANEXOS	153

LISTA DE FIGURAS

I – INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Anthonomus grandis* **3**
- Figura 2.** Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino de insetos da ordem Coleoptera **7**
- Figura 3.** Diagrama da via do mevalonato e biossíntese de hormônio juvenil em insetos **11**
- Figura 4.** Processo de endocitose mediado por receptor durante a vitelogênese em mosquitos **13**
- Figura 5.** Mecanismo básico de RNA interferente (RNAi) **21**
- Figura 6.** Representação esquemática do ciclo de vida do nematoide das galhas **24**

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Dissecção da larva de *Anthonomus grandis* **50**
- Figura 2.** Dissecção do adulto de *Anthonomus grandis* **51**
- Figura 3.** Sequências dos produtos de PCR gerados com os *primers* dos genes candidatos de referência **57**
- Figura 4.** Valores de estabilidade de expressão média (M) dos nove genes referência candidatos de *Anthonomus grandis* utilizando geNorm **63**
- Figura 5.** Análise de variação *pairwise* dos fatores de normalização para determinar o número ótimo de genes referência para a normalização calculado pelo geNorm **64**

- Figura 6.** Valores de estabilidade de expressão dos gene referência candidatos analisados pelo NormFinder **66**
- Figura 7.** Valores de estabilidade de expressão dos gene referência candidatos analisados pelo NormFinder por grupo **67**

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Desenho esquemático do processo de transcrição *in vitro* dos genes alvo utilizando o kit de transcrição MEGAscript® RNAi Kit (Ambion®) **88**
- Figura 2.** Foto da microinjeção em fêmea de *Anthonomus grandis*, utilizando seringa Hamilton de 10 µL **89**
- Figura 3.** Esquema do modelo experimental utilizado **90**
- Figura 4.** Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos da Vitelogenina em diferentes fases do desenvolvimento de *Anthonomus grandis* **94**
- Figura 5.** Citolocalização da Vitelogenina em oócitos de *Anthonomus grandis* **96**
- Figura 6.** Quantificação do acúmulo de transcritos por qRT-PCR da Vitelogenina em fêmeas de *Anthonomus grandis* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA para Vitelogenina **98**
- Figura 7.** Quantificação do acúmulo de transcritos por qRT-PCR da Vitelogenina em fêmeas de *Anthonomus grandis* após microinjeção de 500 ng de dsRNA para Vitelogenina **99**
- Figura 8.** Dados biológicos do bioensaio de silenciamento do gene da Vitelogenina em fêmeas de *Anthonomus gradis* **101**

- Figura 9.** Morfologia externa dos ovos de *Anthonomus grandis* ovipositados por fêmeas oriundas do bioensaio de silenciamento gênico **103**
- Figura 10.** Cortes de ovos de *Anthonomus grandis* ovipositados por fêmeas microinjetadas com dsRNA para Vitelogenina 96 horas após oviposição **104**

CAPÍTULO 3

- Figure 1.** Expression pattern of three KRPpro:GUS lines in galls of Arabidopsis roots infected with *M. incognita* **141**
- Figure 2.** Ectopic KRP expression significantly affects the size of galls induced by *M. incognita* **142**
- Figure 3.** Giant cell surface measurements of overexpressing lines at different stages of nematode infection **143**
- Figure 4.** Nuclear reorganization and flow cytometry analysis in KRP3^{OE} galls induced by *M. incognita* in Arabidopsis roots **144**
- Figure 5.** KRP3-GFP, GFP-KRP5 and GFP-KRP7 localization in Arabidopsis during cell division **145**
- Figure 6.** KRP3 protein localization in giant cells during nematode parasitism in a gall 30 DAI **146**
- Figure 7.** Nematode infection tests of KRP3^{OE} compared to wild-type Col-0 **147**
- Figure S1.** Expression patterns of the three KRPpro:GUS Arabidopsis lines during gall development **149**
- Figure S2.** Histological analysis of gall tissues in *krp* knockout lines of Arabidopsis upon infection with *M. incognita* **150**
- Figure S3.** Nematode infection tests of *krp3* and *krp5* compared to wild-type Col-0 **151**

Figure S4. Plant morphology of KRP overexpression lines used for *M. incognita* inoculation assays **152**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** *Primers* utilizados nos experimentos de qRT-PCR **52**
- Tabela 2.** Função dos genes selecionados para os experimentos de validação de genes referência de *Anthonomus grandis* **53**
- Tabela 3.** Análise estatística descritiva dos nove genes referência candidatos de *Anthonomus grandis* baseado no valor de Cq, como calculado pelo algoritmo Bestkeeper **60**
- Tabela 4.** Análise da combinação de dois genes candidatos com menor valor de M, calculado pelo NormFinder **68**
- Tabela 5.** Ranking dos nove genes referência candidatos de *Anthonomus grandis* de acordo com os valores de estabilidade utilizando as análises dos algoritmos BestKeeper, geNorm e NormFinder **69**

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Lista dos *primers* utilizados neste trabalho **84**
- Tabela 2.** Medidas da cápsula cefálica de larvas de *Anthonomus grandis* para determinação do número de ínstaes **92**

CAPÍTULO 3

- Table S1.** Primers used for RT-PCR **148**

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Anticorpo

ARF: Aparelho reprodutor feminino

ARM: Aparelho reprodutor masculino

ArgK: Arginina quinase

B-ACT: β -actina

B-TUB: β -tubulina

CD: Coeficiente de determinação

Cp: *Crossing point*

Cq: Ciclo de quantificação

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: Dimetilsulfóxido

dsRNA: RNA dupla-fita

EF1A: Fator de alongação 1a

GAPDH: glutraldeído 3-fosfato desidrogenase

GUS: β -glucuronidase

HAE: Horas após emergência

HJ: Hormônio juvenil

InVar: Variância intrínseca

Kb: Quilobase

nt: Nucleotídeo

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia polimerase

PIPES: piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanesulfônico)

PTGS: Silenciamento gênico pós-transcricional

qRT-PCR: Reação em cadeia polimerase quantitativa após transcrição reversa

RDML: *Real-time PCR Data Markup Language*

RdRP: RNA polimerase dependente de RNA
RISC: Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAi: RNA interferente
RPS3: Proteína ribossomal subunidade 3
RPS11: Proteína ribossomal subunidade 11
RPS18: Proteína ribossomal subunidade 18
RPS26: Proteína ribossomal subunidade 26
RPL13a: Proteína ribossomal L13a
SD: Desvio padrão
Sid-1: *Systemic RNA interference deficient-1*
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único
siRNA: pequenos RNAs de interferência
UBQ: Ubiquitina
Vtg: Vitelogenina
20E: 20-hidroxicdisona

Resumo Geral

O Brasil é o quinto maior produtor de algodão do mundo, e também um dos maiores produtores mundiais de fibra, contribuindo positivamente para a balança comercial. O algodão é atacado por uma série de pragas, sendo o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*, um dos insetos-pragas mais destrutivos. Além do bicudo-do-algodoeiro, o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* é uma praga importante desta e de outras culturas. O presente trabalho foi realizado visando o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle destas duas pragas agrícolas. No caso de *A. grandis*, a técnica do silenciamento gênico por RNAi foi utilizada para estudar a importância da Vitelogenina (proteína envolvida na reprodução dos insetos) para este inseto-praga. A técnica de RNAi é utilizada como ferramenta de validação funcional de genes e para o controle de pragas, e vem sendo utilizada na nova geração de plantas transgênicas. Isto em vista, no presente trabalho foram avaliados os efeitos do silenciamento gênico da vitelogenina de *A. grandis* (*Agvtg*) na biologia e no desenvolvimento do inseto adulto e da progênie. Inicialmente, foi realizado um estudo para identificar os melhores genes referência a serem utilizados em estudos gerais de qRT-PCR com este inseto. Após esta identificação, foi determinado o padrão de expressão do gene *Agvtg* e verificou-se a presença de transcritos em diferentes fases do desenvolvimento do inseto através de qRT-PCR. A proteína (AgVtg) foi localizada, por imunocitoquímica, em oócitos em desenvolvimento. Após microinjeção de dsRNA para *Agvtg* (dsVtg) em fêmeas de *A. grandis*, foi verificada uma significativa diminuição no acúmulo de transcritos deste gene. Além disto, verificou-se que as fêmeas tratadas com o dsVtg são capazes de produzir ovos na mesma quantidade dos tratamentos controle, porém, a maior parte dos ovos era inviável. Estudos realizados por meio de microscopia dos ovos oriundos de fêmeas tratadas com dsVtg revelaram, ainda, diferentes fenótipos, correspondentes a paralisação do desenvolvimento do embrião em diferentes estágios de desenvolvimento, indicando, provavelmente, diferentes níveis de silenciamento gênico. Os estudos realizados com *M. incognita*, por sua vez, foram feitos utilizando uma estratégia distinta da anterior. Sabe-se que o nematoide das galhas estimula o ciclo celular das células hospedeiras das plantas, assim, foram utilizadas linhagens de plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando proteínas inibidoras do ciclo celular de plantas (KRPs) e mutantes que não expressam estas proteínas para avaliar o efeito no ciclo de vida do patógeno. Esse trabalho nos permitiu demonstrar a possível função de KRP3, KRP5 e KRP7 em galhas induzidas por nematoides. Nossos resultados demonstram que todos os membros desta família afetam a progressão do ciclo celular durante a formação de galhas de forma diferente, afetando o ciclo de vida do nematoide. Assim, os dados gerados neste trabalho certamente contribuirão consideravelmente para o desenvolvimento de novas técnicas e ferramentas para o controle da principal praga do algodão no país, o bicudo-do-algodoeiro, e do nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*.

Abstract

Brazil is ranked as the fifth world cotton producer, being also one of the largest fiber producers in the world, leading in high contribution to the commercial trade. Cotton is produced in monoculture system, and it is attacked by a large number of pests. The cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, is one of the most destructive pests of cotton. Also, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is an important pest that infect many plants species including cotton. The present work was conducted to develop biotechnological tools for the control of these two agricultural pests. In the case of *A. grandis*, the technique of gene silencing by RNAi was used to study the importance of vitellogenin (protein involved in reproduction) for this insect pest. The RNAi technique is used as a tool for validation of gene function and pest control, and is used in the new generation of transgenic plants. The present study evaluated the effects of gene silencing of vitellogenin in *A. grandis* (*Agvtg*) in biology, development of the adult insect and its progeny. Initially, a study was conducted to identify the best reference genes to be used in general studies qRT-PCR with this insect. After, it was determined the expression pattern of *Agvtg* gene and the presence of transcripts at different stages of insect development was verified by qRT-PCR. The protein (*AgVtg*) was located by immunocytochemistry in developing oocytes. After microinjection of dsRNA for *Agvtg* (*dsVtg*) in *A. grandis* females, there was a significant decrease in transcripts accumulation of this gene. Furthermore, it was found that females treated with *dsVtg* are able to produce eggs in the same amount of control treatments, however, most of the eggs was not viable. Studies performed by microscopy of the eggs that came from females treated with *dsVtg* also revealed different phenotypes, corresponding to paralysis of embryo development in different stages of development, probably indicating different levels of gene silencing. Studies realized with *M. incognita*, were made using a different strategy from above. It is known that the root-knot nematode stimulates the cell cycle of the host cells in plants. So *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing cell cycle inhibitory proteins from plants (KRPs) and also mutants which do not express these proteins were used to evaluate the effect the pathogen life cycle. This work allowed us to demonstrate the possible role of KRP3, KRP5 and KRP7 in galls induced by nematodes. Our results demonstrate that all members of this family affect cell cycle progression during gall formation differently, thus affecting the nematode life cycle. Thus, the data generated in this study will certainly contribute significantly to the development of new techniques and tools for the control of major cotton pest in the country, cotton boll weevil, and the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*.

I – INTRODUÇÃO

I.i. Introdução geral

O agronegócio é, nos dias de hoje, uma das bases mais importantes da economia de países em desenvolvimento. No Brasil, as principais culturas agrícolas que sustentam a economia são: algodão, soja, milho, feijão, café, cana-de-açúcar, entre outras (Contini et al., 2006). Estas culturas contribuem relevantemente no PIB brasileiro, na geração direta e indireta de empregos, e na cadeia produtiva ou em produtos derivados (Avellar e Vilela, 2006). No entanto, a maioria destas culturas, como o algodão, é cultivada em grandes áreas em sistema de monocultura, o que favorece a incidência de pragas (Gallo et al., 2002; Haq et al., 2004).

A produção brasileira de algodão compreende cerca de 5% da produção internacional. O algodoeiro é considerado uma das plantas cultivadas mais susceptíveis ao desenvolvimento e ataque de pragas, com mais de 20 (vinte) espécies relatadas e conhecidas (Gallo et al., 2002). Os principais insetos-praga que infestam a cultura do algodão são: a lagarta da maçã – *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta rosada – *Pectinophora gossypiella* (Saund, 1844) (Lepidoptera - Gelechiidae), o curuquerê – *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), o bicudo-do-algodoeiro – *Anthonomus grandis* Boh., 1843 (Coleoptera: Curculionidae) e a lagarta do cartucho do milho – *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Dentre os quais, o bicudo-do-algodoeiro é uma praga de maior importância econômica, devido a sua rápida capacidade reprodutiva e de destruição de botões florais e de maçãs (Haynes e Smith, 1992). Os níveis de infestação por este inseto crescem rapidamente e os prejuízos podem atingir até 100% da produção caso as medidas de controle não sejam adequadas (Gallo et al., 2002). Além dos insetos praga, o algodoeiro também é atacado por nematoides, como o nematoide de galhas das raízes, *Meloigodyne incognita*, que causa grandes perdas na cultura (Koenning et al., 2004).

A forma de controle de pragas mais utilizada na cultura do algodão é o controle químico, o que aumenta substancialmente os custos de produção, além de provocar danos à natureza e a saúde dos trabalhadores do campo. Diante disto, vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes. Com o advento do Manejo Integrado de Pragas (MIP), várias estratégias têm sido estudadas e utilizadas em harmonia com sucesso, modificando, aos poucos, a visão dos agricultores com relação ao uso indiscriminado de inseticidas. Dentro deste contexto, a utilização de ferramentas biotecnológicas e a transformação genética de plantas surgiram como uma estratégia promissora para a obtenção de cultivares mais produtivas e resistentes, além de serem menos prejudiciais ao meio ambiente e reduzirem custos de produção (Gallo et al., 2002).

A prospecção de novos genes e proteínas, juntamente com o desenvolvimento de plantas transgênicas é uma estratégia promissora para o controle de insetos-praga em diversas etapas do seu ciclo de vida. Por exemplo, plantas modificadas geneticamente contendo genes de resistência, toxinas proteicas como as *Cry* de *Bacillus thuringiensis* (Mahon e Olsen, 2009) ou expressando dsRNA dirigindo o RNA interferente (Baum et al., 2007) tem sido usados como novas ferramentas de controle de pragas.

I.ii. O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*)

Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae), o bicudo-do-algodoeiro, é uma das pragas mais destrutivas do algodão cultivado *Gossypium hirsutum* L. nas Américas. É um inseto de reprodução sexuada e possui uma grande capacidade reprodutiva. No ciclo normal da cultura do algodão, o bicudo pode produzir de três a sete gerações, dependendo das condições de umidade e temperatura (Gallo et al., 2002). O inseto adulto migra para a cultura na época de florescimento, ataca inicialmente os botões florais, flores e maçãs (frutos) pequenas, podendo se alimentar, também, de folhas jovens e pecíolo, caso faltem os outros órgãos relacionados (Gallo et al., 2002). Após o ataque, os botões tornam-se amarelos,

as brácteas abrem-se e os botões caem. As flores atacadas ficam com o aspecto de balão, devido a não abertura normal das pétalas. As maçãs apresentam perfurações externas, decorrentes do hábito de alimentação e oviposição do inseto adulto, sendo que as fibras e sementes também são danificadas pela alimentação das larvas, o que impede a abertura normal da maçã, deixando-as enegrecidas. O bicudo ataca principalmente algodoeiros cultivados e utiliza outras espécies, principalmente da família Malvacea, como hospedeiros alternativos. Este coleóptero é originário da América Central e atualmente encontra-se disseminado em várias partes do mundo (Santos e Santos, 1997). Esta espécie, como todos os coleópteros, apresenta o desenvolvimento completo (holometábolo), compreendendo a fase de ovo, larva, fase de pupa e adulto (Figura 1).

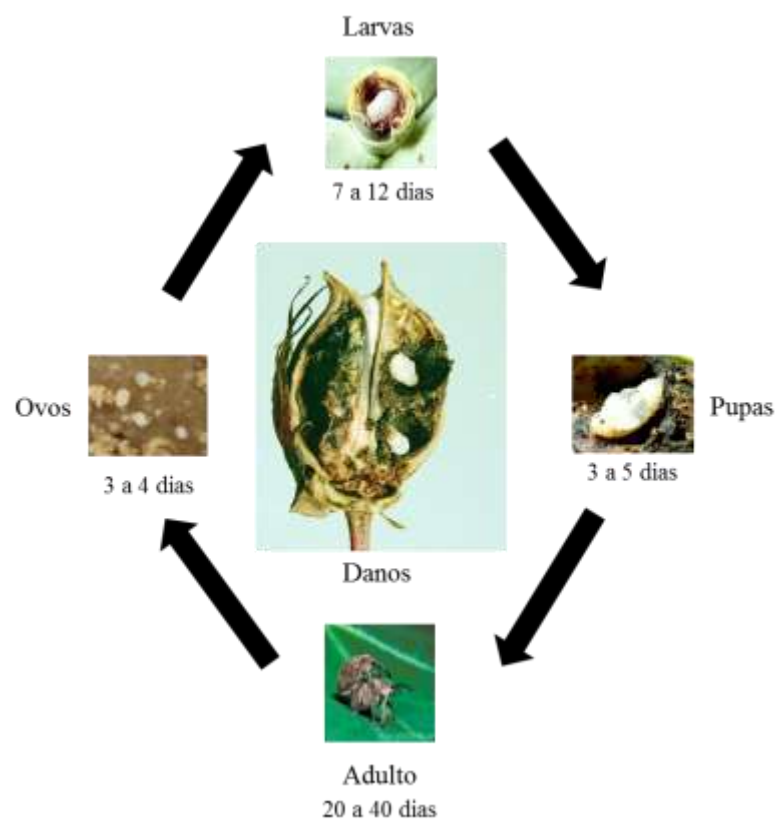


Figura 1. Ciclo de vida de *Anthonomus grandis*. As fêmeas, após o acasalamento, colocam os ovos no interior dos botões florais. As larvas então se alimentam do conteúdo do botão floral até atingir a fase de pupa, quando param de se alimentar até completar a metamorfose e o adulto sair do botão floral. O tempo de permanência em cada estágio depende das condições de umidade e temperatura. Adaptado de Gallo et al. (Gallo et al., 2002).

A identificação do bicudo-do-algodoeiro no Brasil deu-se em fevereiro de 1983, na região de Campinas, SP, veio adicionar esta praga de grande importância à enorme lista de pragas exóticas introduzidas no Brasil desde o seu descobrimento (Barbosa et al., 1986).

Desde o início do primeiro programa de erradicação em 1978, o bicudo foi erradicado em vários estados no sudoeste e sudeste dos Estados Unidos (Smith, 1998; Carter et al., 2001; El-Lissy e Grefenstette, 2006). No entanto, este processo continua em curso em partes de sete estados dos Estados Unidos e no nordeste do México. No Texas, o programa de erradicação do bicudo foi iniciado em 1995, e atualmente, 17 zonas estão em diferentes estágios de controle. O bicudo foi erradicado de várias zonas no centro e oeste do Texas, mas várias outras zonas permanecem infestadas em vários níveis. Após a erradicação ter sido declarada completa pelas autoridades para uma zona particular, um programa de manutenção pós-erradicação foi iniciado onde foi implantado um conjunto sistemático de armadilhas com feromônios e regularmente monitorado quanto à reintroduções (Kim et al., 2009). O ponto chave destes programas de erradicação e pós-erradicação nos Estados Unidos são as armadilhas de feromônios (Smith, 1998; Sappington e Spurgeon, 2000; Spurgeon, 2003; Spurgeon e Raulston, 2006), que são feitas com feromônio de agregação que atrai machos e fêmeas (Hardee et al., 1969; Gueldner et al., 1971). No entanto, no Brasil, esta ferramenta não demonstrou um resultado satisfatório de controle, sendo atualmente, mais importante para o monitoramento desta praga em campo, do que para o controle propriamente dito.

O controle do bicudo por meio da utilização de inseticidas químicos no Brasil é bastante oneroso, visto que os inseticidas mais eficientes são os que atuam no estágio endofítico da espécie, os quais apresentam o custo ainda mais elevado, tanto pela quantidade utilizada a cada aplicação, como pela sua frequência. O plantio de plantas com florescimento precoce ou plantio-isca e controle biológico são ferramentas utilizados no manejo integrado do bicudo-do-algodoeiro (Gallo et al., 2002). Além disso, programas de melhoramento vegetal

por meio de transgenia consistem numa via alternativa aos métodos convencionais para o controle de insetos-praga (Morton et al., 2000; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002). Deve-se ressaltar que as variedades de algodão GM difundidas no mercado, como Bollgard® e Bollgard®II (Monsanto, EUA) não são resistentes ao bicudo-do- algodoeiro e, portanto, não controlam a principal praga da cultura do algodão no Brasil.

Entretanto, para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas de controle como a transgenia, é necessário, por exemplo, o conhecimento a respeito dos genes essenciais para determinados processos biológicos importantes para a manutenção deste inseto. Isto nos permitirá a elaboração de estratégias mais específicas e eficientes que tenham como alvo direto estes mesmos mecanismos. Assim, sabendo-se que é o inseto adulto que coloniza o plantio de algodão, faz-se necessário um estudo mais detalhado a respeito de processos intrínsecos desta fase, como características relacionadas à sua reprodução, por exemplo.

I.iii. Reprodução dos insetos – Regulação hormonal da oogênese e vitelogênese

Os insetos são os animais mais abundantes do planeta e isto se deve, dentre outros fatores, ao seu sistema de reprodução. Apesar de insetos de vida curta terem uma oportunidade reprodutiva bastante restrita, eles compensam com uma diversidade de estratégias que permitem a produção de uma prole bastante considerável, sob uma gama de circunstâncias ecológicas. Estas estratégias incluem partenogênese, pedogênese, poliembrionia, hermafroditismo funcional, viviparidade, reprodução bissexual e oviparidade (Klowden, 2007).

A organização dos sistemas reprodutivos, masculino e feminino, é bastante similar. As células germinativas dos órgãos reprodutivos originam-se das células do polo juntamente com o tecido mesodérmico. Um par de gônadas é conectado por dutos individuais de origem mesodérmica e ectodérmica. Ambos os sistemas

reprodutivos são coordenados por hormônios e fatores de transcrição, que são, por sua vez, regulados por fatores biológicos e ambientais (Klowden, 2007).

a. Anatomia geral e origem dos órgãos reprodutivos femininos

A anatomia geral dos órgãos femininos de insetos do gênero da família Curculionidae consiste normalmente de dois ovários emparelhados, cada um com apenas dois ovaríolos os quais liberam seus oócitos maduros (ovos) através dos cálices para os ovidutos laterais que se unem para formar o oviduto comum (Figura 2) (Swiatek e Klag, 1997; El Naggar et al., 2010). A câmara genital serve como uma bolsa copulatória durante o acasalamento. Ela possui dois tipos de glândulas ectodérmicas (glândula da espermateca e glândulas acessórias) que se abrem na câmara genital e a espermateca, que armazena os espermatozoides até o momento da fecundação dos ovos. (Nation, 2008; El Naggar et al., 2010). Os ovaríolos são geralmente politróficos e cada ovaríolo possui uma corda de câmaras de ovos chamada folículos (Nation, 2008; El Naggar et al., 2010; Triplehorn e Johnson, 2011). Os ovaríolos são uma série de tubos de ovos pontiagudos e são as unidades funcionais do ovário, que contém uma sequência de oócitos em desenvolvimento. O número de ovaríolos em cada ovário varia grandemente dependendo do tamanho e estratégia reprodutiva da espécie de inseto. Os oócitos geralmente iniciam seu crescimento no final anterior do ovaríolo. Este local, chamado de geminário, contém células tronco germinativas dentro de um microambiente, onde estas células são envoltas por três folículos diferenciados: células do filamento terminal, células “cap” e células da bainha interna (Klowden, 2007).

Os ovários de insetos podem ser classificados em dois tipos principais: se existem trofócitos (células nutritivas) associados ao ovo em desenvolvimento são meroísticos ou, se não possuem trofócitos são panoísticos. O primeiro tipo pode ainda ser dividido em politrófico, no qual cada oócito é associado com trofócitos no seu folículo ou num folículo adjacente; e telotrófico, onde os trofócitos são localizados na extremidade distal do ovaríolo na região do geminário, e conectados por um longo cordão, por onde passam os nutrientes e genes maternos para cada oócito (Nation, 2008).

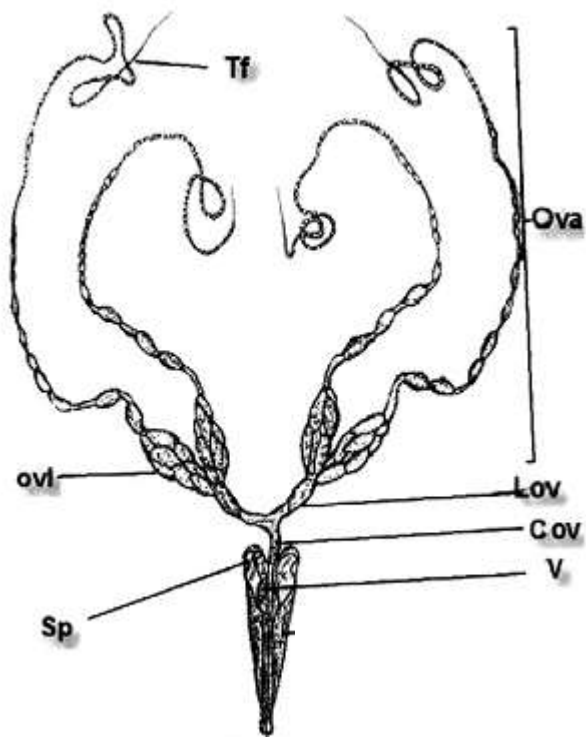


Figura 2. Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino de insetos da ordem Coleoptera. Cov. = oviduto comum, Lov. = oviduto lateral, Ovl. = ovariolo, Ova. = ovário, Sp. = espermateca, Tf. = filamento terminal, V. = vagina. Adaptado de El Naggat et al. (2010).

Durante a embriogênese, a maior parte do ovário se desenvolve a partir da mesoderme, que suporta o desenvolvimento das células germinativas no ovário, e outras células anteriores dão origem a um ligamento suspensor no final anterior que une todos os ovaríolos e ancora o ovário à parede do corpo. O oviduto lateral conecta os ovaríolos aos finais posteriores e combinam no oviduto comum, que é derivado ectodermicamente (Klowden, 2007; Triplehorn e Johnson, 2011).

As oogônias (células germinativas primárias) estão localizadas na porção apical anterior do ovaríolo, o geminário. As oogônias sofrem mitose, originando os oócitos e os trofócitos. O oócito, o epitélio circulante e os trofócitos (em ovaríolos politróficos) formam um folículo. No vitelário (última porção do ovaríolo antes de entrar no oviduto lateral), os oócitos aumentam muito de tamanho em razão da deposição do vitelo, no processo de vitelogênese (Triplehorn e Johnson, 2011). Quando a maturação do oócito está próxima do fim, a membrana vitelínica é secretada, seguida pela excreção da parede do ovo, ou córion. Após a deposição do córion, quando o ovo passa pelo oviduto, dispara receptores que estimulam os músculos da espermateca e para contrair e liberar o esperma que estava lá estocado (Klowden, 2007; Nation, 2008). Então, após a ovulação e fertilização, os ovos são usualmente depositados fora do corpo da fêmea pelo processo de oviposição.

b. Regulação hormonal da reprodução e vitelogênese

A regulação da reprodução em insetos é bastante complexa e envolve receptores sensoriais, transmissão neuronal e integração das mensagens do cérebro, bem como mensageiros químicos (hormônios) transportados pela hemolinfa ou pelos axônios neuronais para os tecidos-alvo ou para outras glândulas endócrinas. Na maioria dos insetos, vários hormônios regulam a oogênese, síntese de vitelo e aspectos adicionais da reprodução, como produção de feromônios, cópula e oviposição. No entanto, os hormônios que controlam estes processos não são os mesmos em todos os insetos (Nation, 2008).

Um fator limitante na habilidade do inseto ter sucesso reprodutivo é a disponibilidade de nutrientes durante a oogênese (Wheeler, 1996). Geralmente,

durante a embriogênese proteínas são utilizadas como fontes de aminoácidos (McGregor e Loughton, 1977), enquanto que carboidratos e lipídeos são usados como fonte de energia (Beenackers et al., 1981; Steele, 1981). Assim, células vitelínicas tem um papel importante no estoque de nutrientes em ovos de insetos. Neste sentido, o macho pode contribuir com nutrientes para a fêmea durante a corte e cópula (Boggs, 1990) tanto oferecendo “presentes nupciais” como fornecendo nutrientes por meio do fluido seminal e o espermátóforo.

Os hormônios controlam o crescimento do ovário, a síntese de vitelogenina (Vtg) pelos corpos gordurosos e o acúmulo de Vtg pelos oócitos em desenvolvimento (Adams e Filipi, 1983; Hagedorn, 1985). Os insetos podem ser divididos em três grupos quanto à regulação hormonal da transcrição da Vtg. O primeiro inclui insetos que utilizam apenas hormônio juvenil (HJ) produzido pelos *corpora allata* (um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral) para a expressão de Vtg (Wyatt e Davey, 1996; Raikhel et al., 2004). O segundo tipo, que inclui os insetos da ordem Diptera, requer HJ e ecdisona (Hagedorn et al., 1975). E o outro, inclui os lepidópteros, que necessitam de HJ, ecdisteróides e outros hormônios para regular a reprodução (Wyatt e Davey, 1996; Bellés, 1998; Raikhel et al., 2004; Bellés, 2005). No caso de Coleoptera, Engelmann (1983) demonstrou que o HJ é responsável pela síntese de Vtg em *Leptonotarsa descemlineata*, em *Tenebrio molitor* e em alguns outros. É importante salientar que em alguns insetos, o estímulo para o início de produção e secreção de vitelogenina na hemolinfa ocorre a partir dos corpos gordurosos estimulados pelos hormônios citados anteriormente (Klowden, 2007).

Neste contexto, o HJ funciona como um importante fator regulador na embriogênese, desenvolvimento larval e adulto, metamorfose, reprodução, diapausa, migração e outros processos (Hammock, 1985; Roe e Venkatesh, 1990; Nijhout, 1994; de Kort e Granger, 1996). Todas estas funções tornam o HJ um componente essencial para o entendimento dos diversos processos biológicos dos insetos. O HJ é sintetizado nos *corpora allata* (Gilbert et al., 2000), e sua quantidade na hemolinfa está diretamente relacionada à sua produção pelos

corpora allata, uma vez que não são conhecidas informações sobre estocagem neste órgão.

A rota de produção do HJ envolve a formação de dois importantes precursores: o mevalonato, que envolve a ação das enzimas acetoacetil-CoA tiolase, 3-hidroxi-3-metilgluratil-CoA sintase (HMG-S) e a 3-hidroxi-3-metilgluratil-CoA redutase (HMG-R). O segundo precursor, o farnesil difosfato, envolve a ação das enzimas, o farnesil difosfato sintase, fosfomevalonato quinase, difosfomevalonato descarboxilase, JH metil transferase e JH epoxidase (Bellés et al., 2005; Kinjoh et al., 2007) (Figura 3). A degradação do HJ, por outro lado, ocorre por ação de duas enzimas: hormônio juvenil esterase (HJE) e hormônio juvenil epóxido hidrolase (HJEH).

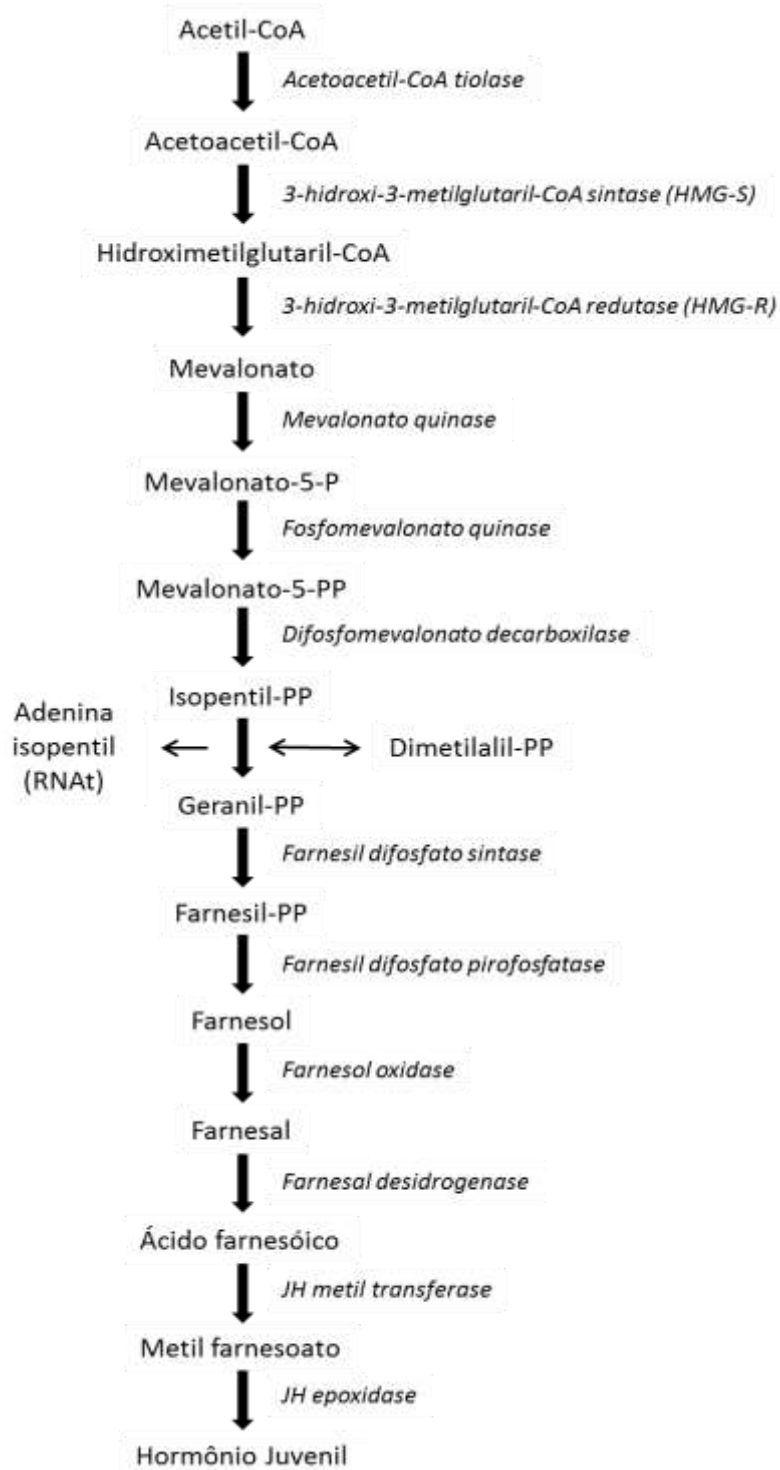


Figura 3. Diagrama da via do mevalonato e biossíntese de hormônio juvenil em insetos. Adaptado de Bellés et al., 2005.

No que diz respeito aos ecdisteroides, as glândulas protorácicas são sua principal fonte durante o desenvolvimento pós-embrionário dos insetos (Rees, 1985; Redfern, 1989). Há evidências de que há produção de ecdisteróides no abdômen de *Tenebrio molitor*, tendo a epiderme como fonte primária (Delbecque et al., 1990). Ecdisona é o precursor imediato do principal hormônio de muda, o 20-hidroxiecdisona (20E), que em adultos é produzido principalmente nos ovários e também, está envolvido na reprodução em alguns insetos (Riddiford, 1993). No entanto, ainda não se sabe como exatamente os tipos de células do ovário contribuem para a síntese de ecdisona e sua conversão em 20E (Kozlova e Thummel, 2000; Schwedes e Carney, 2012).

Assim, com o estímulo hormonal, as células dos corpos gordurosos começam a produção de proteínas vitelínicas, a maior parte das quais são glicolipofosfoproteínas (Vtg) de aproximadamente 200 kDa (Tufail et al., 2005) Estas podem representar entre 60 e 90% do total de proteínas solúveis no oócito. As vitelogeninas são sintetizadas como precursores simples que são clivados logo antes de serem exportados para a hemolinfa pelos corpos gordurosos. Através de fagocitose mediada por receptor, são então transportadas para o oócito, consistindo, nesta etapa, de duas ou mais subunidades de vitelogenina, comumente chamadas de vitelo (ou vitelina).

Lipídeos sintetizados nos corpos gordurosos também são depositados nos oócitos e podem representar até 40% do peso seco de um ovo (Atella et al., 2005). Estes lipídeos são principalmente triacilgliceroides com quantidades menores de colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos livres (Klowden, 2007). As lipoforinas, que são moléculas que transferem lipídeos de um tecido para outro, são responsáveis por este transporte, e são depositadas nos oócitos a partir do vitelário (van Antwerpen et al., 2005; Klowden, 2007).

A internalização da vitelogenina nos oócitos descrita por Klowden (Klowden, 2007) (Figura 4) envolve endocitose mediada por um receptor de vitelogenina específico na membrana celular que reconhece e se liga fortemente à vitelogenina. Esta via de endocitose é dependente de clatrina, que se acumula nos locais onde o receptor se liga à vitelogenina e o complexo é internalizado em

vesículas cobertas de clatrina (Raikhel, 1984, 1987; Raikhel e Dhadialla, 1992; Izumi et al., 1994; Rajaratnam, 1996; van Antwerpen et al., 2005). A capa de clatrina é então perdida formando endosomos que se fundem para formar células vitelínicas transicionais. Então, a vitelogenina e os receptores se dissociam e estes são reciclados em compartimentos tubulares enquanto que a vitelogenina é adicionada aos corpos vitelínicos maduros em forma cristalizada (vitelina).

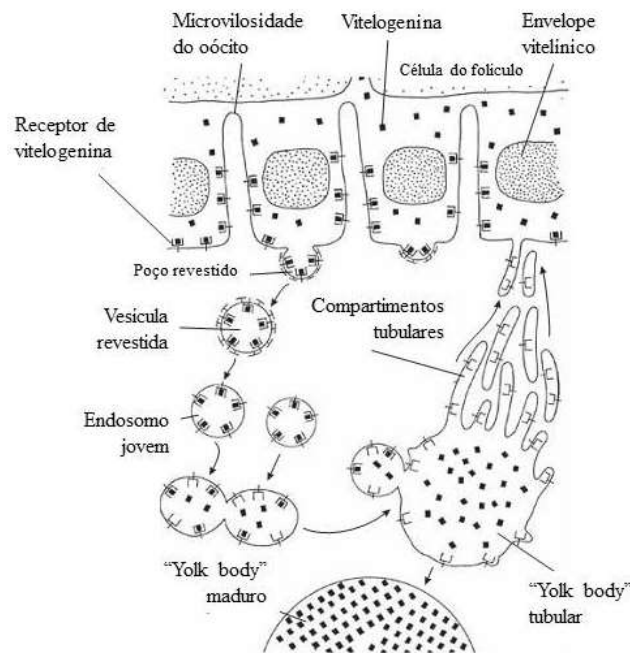


Figura 4. Processo de endocitose mediado por receptor durante a vitelogenese em mosquitos. A vitelogenina entra a partir da hemolinfa entre as células do folículo através dos poros dentro do envelope vitelínico. Então, ela se liga a receptores na membrana plasmática acumulando em poços revestidos de clatrina que invaginam dentro do citoplasma do oócito e formam vesículas revestidas. Quando as vesículas revestidas perdem sua clatrina, se tornam endossomos jovens que se fundem para formar um grande corpo vitelínico tubular. Os receptores de vitelogenina são reciclados para a membrana plasmática por meio de compartimentos tubulares. Adaptado de Snigirevskaya et al. (1997).

A vitelogenina que é levada ao oócito pode ser nele processada para criar sua forma cristalina, a vitelina, que é estocada em esferas de vitelo. A vitelina e a vitelogenina são imunologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferentes em solubilidade e mobilidade eletroforética (Klowden, 2007; Tufail e Takeda, 2008). Além dos corpos vitelínicos, o citoplasma dos oócitos também inclui gotas de lipídeos que contêm triglicerídeos e fosfolipídeos, assim como grânulos de glicogênio.

Ao fim da vitelogênese, as células foliculares produzem o envelope vitelínico, uma membrana que envolve o oócito. O último ato sintético das células foliculares é a coriogênese, que é a secreção do córion, uma camada intrincada de proteínas que é posta sequencialmente para formar uma barreira semipermeável ao ambiente. Uma vez que o córion é secretado, esta camada restringe a entrada e saída de substâncias, com exceção do esperma que entra através de um micropilo especializado. Quando esta síntese é completada, as células foliculares degeneram e o córion se torna a camada mais externa do ovo (Klowden, 2007; Triplehorn e Johnson, 2011).

Trabalhos iniciais sugeriram que as proteínas vitelínicas são sexo-específicas e encontradas apenas em fêmeas. Porém, posteriormente, alguns trabalhos mostraram pequenas quantidades destas proteínas em machos de algumas espécies. Em alguns machos, estas proteínas podem ser induzidas com tratamentos hormonais (Shirk et al., 1983; Wyatt, 1991). Em abelhas machos haploides (conhecidos como *drones*), por exemplo, foi relatada a presença tanto da vitelogenina, quanto do receptor de vitelogenina (Colonello-Frattini et al., 2010), no entanto não foi sugerida nenhuma função para estas proteínas. Em outro estudo realizado com o lepidóptero *Spodoptera littoralis*, verificou-se a presença destas glicoproteínas do ovo no fluido seminal de machos, o que sugere um fator comum de maturação do ovo (em fêmeas) e do esperma (em machos) (Bebas et al., 2008).

Comparações de Vtgs de insetos tem mostrado que sua estrutura é altamente conservada entre diferentes espécies (Chen et al., 1997; Sappington e Raikhel, 1998; Lee et al., 2000). Os genes de Vtg de insetos codificam,

geralmente, um transcrito de RNAm grande e específico, de aproximadamente 6 – 7 kb e seu número é variável entre as espécies (Tufail et al., 2005). A característica interessante da Vtg de insetos é a existência de sítios de clivagem poliserina, que são conservados na região N-terminal de todas as sequências de Vtg, exceto *Lymatria dispar* (Lepidoptera) e *Anthonomus grandis* (Coleoptera), e Hymenoptera, subordem apocrita (Tufail e Takeda, 2008).

A Vtg é sintetizada nos ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso, subsequentemente transferido para o complexo de Golgi e eventualmente empacotado em grânulos secretores que emergem da rede trans-Golgi (Mazzini et al., 1989; Snigirevskaya et al., 1997b; Giorgi et al., 2005). Durante este processo, a molécula de Vtg nascente é pós-traducionalmente modificada por clivagem proteolítica (Sappington e Raikhel, 1998; Tufail et al., 2005). Estudos com Vtgs de diferentes espécies mostram que estas são sintetizadas como um precursor maior (aproximadamente 200 kDa), que é clivado em duas ou mais subunidades. Estas subunidades são montadas e secretadas juntas como proteínas oligoméricas de alto peso molecular (400 – 600 kDa) (della-Cioppa e Engelmann, 1987).

I.iv. Desenvolvimento embrionário

Durante a oogênese em insetos, proteínas, lipídeos, carboidratos e outros componentes são estocados de maneira organizada dentro dos oócitos em crescimento. Assim, ovos maduros serão empacotados com todos os recursos necessários ao desenvolvimento dos embriões, que irá ocorrer isolado do corpo da fêmea (Postlethweit e Giorgi, 1985; Sappington e Raikhel, 1998).

O ovo de um inseto é uma célula com duas coberturas externas, uma membrana vitelínica fina envolvendo o citoplasma e um córion mais externo. O córion, que constitui uma casca externa mais dura do ovo, possui um poro ou um conjunto de poros minúsculos (a micrópila) em uma extremidade, pelos quais o espermatozoide entra no ovo. Na região imediatamente mais interna à membrana vitelínica está a camada de citoplasma cortical. A porção central do ovo, no

interior do citoplasma cortical, consiste grande parte em vitelo (Triplehorn e Johnson, 2011).

Logo após a penetração do espermatozoide no ovo, o oócito completa a meiose, o que resulta em um oócito haploide e três núcleos polares que estão no periplasma na periferia do ovo. O núcleo do oócito, envolvido por uma ilha de citoplasma, então se move para o centro do ovo onde se encontra com o espermatozoide que já havia entrado (Klowden, 2007). Seguindo a união do espermatozoide com o ovo, o zigoto recém-formado segue para a clivagem, processo pelo qual o zigoto se divide mitoticamente em células filhas.

A presença de vitelo no ovo tende a inibir a clivagem, assim animais que tem relativamente pouco vitelo são capazes de submeter-se a clivagem completa ou holoblástica. No entanto, uma grande quantidade de vitelo na maior parte dos ovos de insetos previne que as clivagens cortem completamente o ovo, e sua clivagem é mais superficial, ou meroblástica. Assim, os núcleos dividem sem formação de novas membranas celulares. Porém, nem todos os insetos são meroblásticos (Klowden, 2007).

Durante a clivagem, o núcleo do zigoto entra em divisão mitótica no centro do citoplasma do ovo, mas os núcleos filhos resultantes ou *energids*, não são incorporados em novas células completas. Ao invés disso, após uma série de mitoses, os *energids* migram para a periferia do ovo com sua ilha de citoplasma e continuam a se dividir. Na periferia, os *energids* primeiro formam um blastoderma sincicial sem qualquer membrana, contendo todos os núcleos clivados no citoplasma comum ao do ovo (Klowden, 2007). Outros *energids* param de se dividir mitoticamente e ao invés de migrar para a periferia, cerca de 20 se mantêm no vitelo para formar os vitelófagos, que estarão envolvidos mais tarde na digestão de vitelo e formação do epitélio do mesêntero. As membranas então começam a se desenvolver em torno de cada núcleo no blastoderma sincicial criando um blastoderma celular (Klowden, 2007).

Existem dois tipos de desenvolvimento embrionário em insetos, baseado na banda germinativa. G. Krause (1939) observou que alguns insetos produzem

ovos nos quais os antecedentes dos futuros segmentos do embrião são representados e padronizados durante o estágio de blastoderme sincicial. O embrião preenche a maior parte do ovo e todos os segmentos do primórdio germinativo estão presentes antes da gastrulação, com uma parte relativamente pequena do ovo destinada ao tecido extra-embriônico. O que foi caracterizado como uma banda germinativa longa. Embriões que representam esta categoria são os Diptera superiores *Drosophila melanogaster* e *Musca domestica* (Sommer e Tautz, 1991; Liu e Kaufman, 2005). Krause (1939) também observou que alguns insetos produzem ovos nos quais maior parte do material é especificado como tecido extra-embriônico, com tecidos germinativos largamente restritos à região posterior-ventral do ovo. Nestes insetos, apenas estruturas embrionárias anteriores são padronizadas no estágio sincicial. Estes são chamados de insetos com banda germinativa curta.

A embriogênese de banda germinativa longa foi estudada utilizando como modelo *Drosophila* e inicia nos ovários meroísticos. O oócito é especificado como uma das 16 células irmãs, as 15 outras são trofócitos que irão transcrever mensagens maternas codificando os morfogenes, assim como fornecer maquinaria celular e mitocôndria para o oócito se desenvolver rapidamente. Divisões nucleares sinciciais no blastoderma embrionário continuam por 13 ciclos, com o início da transcrição zigótica ocorrendo por volta do ciclo 10, quando os núcleos migram para a periferia do embrião, quando os núcleos são separados por membranas celulares e o embrião se torna celularizado. No final do ciclo 14, a especificação dos segmentos do embrião é alcançada. O plano do corpo do embrião segmentado é então especificado por uma cascata de fatores transcricionais (Spradling, 1993).

A embriogênese de banda germinativa curta foi melhor estudada usando como modelo *Tribolium castaneum*, onde já foram feitos diversos estudos genéticos para identificar os genes envolvidos na segmentação (Sulston e Anderson, 1996, Maderspacher et al., 1998). Insetos de banda germinativa curta produzem embriões que preenchem apenas uma pequena porção do ovo. O embrião sincicial de *Tribolium* apresenta uma forma diferente de *Drosophila* e

sofre uma transição na qual os núcleos agregam na parte ventral posterior do ovo, formando uma camada de células que se tornarão o primórdio embrionário. Quando a gastrulação se inicia, o pit primitivo se forma no futuro final caudal do embrião, que então se dirige para o vitelo. O primórdio germinativo inicia um processo similar a uma extensão convergente enquanto as células se agregam na região posterior e a banda germinativa se estreita e estende anteriormente ao longo da superfície ventral do embrião. Enquanto a cabeça é formada, segmentos são adicionados na parte posterior do corpo do embrião pela adição de células na zona de crescimento, até que a banda germinativa se estende completamente ao longo da parte ventral do embrião, e o final caudal da ectoderme se deposita na superfície dorsal do embrião próximo à cabeça. Na extensão completa, os lóbulos da cabeça são formados e a banda germinativa se retrai. A banda germinativa torna-se abertamente segmentada na parte anteroposterior após o início da gastrulação (Brown et al., 1994).

É importante notar algumas diferenças chave entre estes tipos de desenvolvimento: primeiro, na celularização, apenas os segmentos da futura cabeça e o tórax são representados no primórdio germinativo em insetos de banda germinativa curta. Segmentos abdominais surgem depois a partir da zona de crescimento posterior nestes insetos, enquanto os primórdios segmentos abdominais estão presentes na blastoderme pré-celular em insetos de banda germinativa longa.

I.v. O uso do RNA interferente (RNAi) no estudo de genômica funcional

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um processo que ocorre naturalmente nas células de diversos organismos eucarióticos. É um processo que é altamente conservado em muitos organismos e silencia genes degradando o RNAm antes da tradução. Este processo foi descrito primeiramente em plantas, denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (Jorgensen et al., 1996). Neste trabalho, foi observado que a introdução de certos transgenes

em plantas poderia resultar no silenciamento dependente de homologia de um *locus* endógeno e foi popularmente referido como co-supressão.

Em 1990, cientistas realizaram o primeiro silenciamento por RNA na tentativa de superexpressar uma enzima de síntese de pigmento, a chalcona sintase, para produzir petúnias com tom de roxo mais intenso; no entanto, a maioria das plantas transgênicas produziram flores completamente brancas (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). Este fenômeno foi chamado de “co-supressão” e foi o primeiro a demonstrar a forma de estudar o silenciamento gênico por RNA. Estudos no nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* indicaram que a expressão de fitas senso e anti-senso de RNA poderiam levar a uma inibição específica e efetiva dos genes alvo (Fire et al., 1991; Guo e Kemphues, 1995). Entretanto, a chave que definiu o mecanismo de RNA interferente foi a descoberta de que o RNA dupla-fita (dsRNA) criado para ter como alvo regiões exônicas do genoma produzia uma interferência eficiente. Este método foi mais efetivo para o silenciamento que o método utilizando RNA fita-simples senso ou anti-senso (Fire et al., 1998). Esta técnica foi então chamada de RNA interferente (RNAi) e é mediada por pequenos RNAs de interferência (siRNA) de 20 a 25 nucleotídeos (nt) derivados a partir de dsRNA endógeno ou exógeno. Estas moléculas de siRNA foram descobertas por Hamilton e Baulcombe (Hamilton and Baulcombe, 1999), que encontraram moléculas anti-senso de RNA de 25 nt derivadas do molde de RNA e sugeriram que estes RNAs pequenos poderiam ser a base do silenciamento gênico pós-transcricional. Logo após a descoberta do RNAi em *C. elegans*, foi comprovado o silenciamento gênico mediado por dsRNA também em *Drosophila*, onde foi utilizado para investigar as funções dos genes *frizzled* e *frizzled 2* e determinar sua ação no mecanismo de sinalização do gene *wingless* (Kennerdell e Carthew, 1998). O desenvolvimento da tecnologia do RNAi em espécies de insetos propiciaram o estabelecimento de uma ferramenta para estudar funções gênicas em outros insetos e não apenas drosofilídeos, o que antes não era possível pela falta de mutantes genéticos de outros insetos. Assim, esta técnica se tornou fundamental para a caracterização da função de muitos genes em vários insetos (Brown et al., 1999; Hughes e Kaufman, 2000; Belles, 2010).

Deste modo, o processo de RNAi é iniciado por dsRNAs precursores que variam em comprimento e origem. Estes dsRNAs são rapidamente processados em pequenos duplexes de RNA (siRNA) de 21- 28 nucleotídeos de comprimento, que guiam o reconhecimento e a clivagem ou repressão traducional dos RNAs fita-simples complementares, como os RNAs mensageiros (Katoch e Thakur, 2013). Podemos observar estes processos de forma resumida na figura 7, num modelo adaptado de Bellés (Belles, 2010).

Apesar do fato de a via de RNA interferente operar de forma altamente conservada em diferentes organismos, estes apresentam algumas diferenças nos mecanismos e proteínas. O principal exemplo disso é a amplificação de dsRNA exógeno em plantas, fungos e nematóides, que funciona através de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) (Sijen et al., 2001; Pak e Fire, 2007; Sijen et al., 2007). A RdRP é provavelmente responsável pela resposta destes organismos ao RNAi mediado por dsRNA. No entanto, os genomas de insetos até o momento conhecidos não apresentam homólogos para RdRPs (Gordon e Waterhouse, 2007; Kurscheid et al., 2009; Obbard et al., 2009).

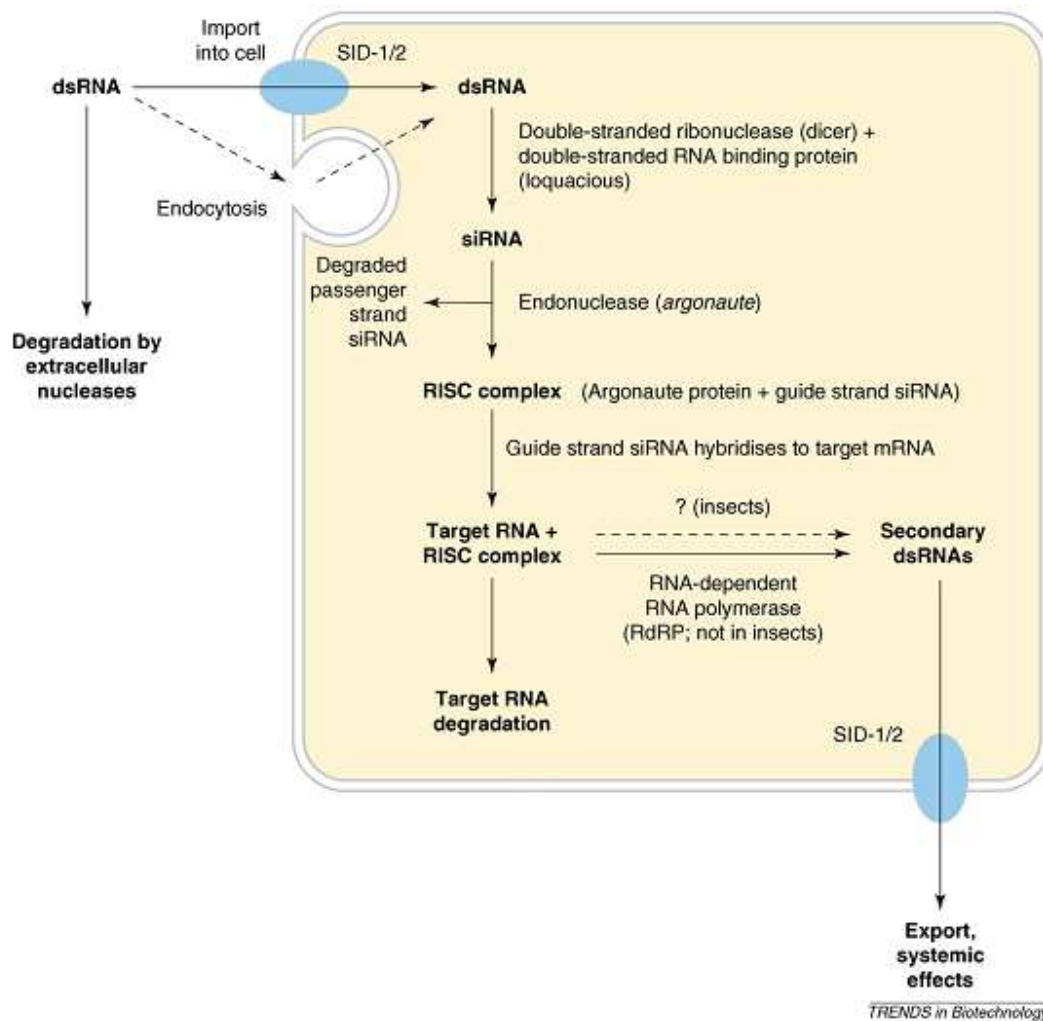


Figura 5. Mecanismo básico de RNA interferente (RNAi) com RNA dupla-fita (dsRNA). O RNA dupla-fita (dsRNA) é importado para dentro das células pelas proteínas SID-1/ SID-2, é clivado em fragmentos de ~21-28 nucleotídeos, pequenos RNAs de interferência (siRNAs) pela enzima Dicer. Os siRNAs soltam as fitas complementares e a fita anti-sense acopla no Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) e ambos se ligam ao RNAm alvo, bloqueando e degradando-o.

Sabe-se que, no entanto, alguns estudos identificaram atividade RdRP-like em extratos de células livres de embriões de *Drosophila* (Lipardi et al., 2001), apesar de não haver evidência de replicação de dsRNA exógeno em Diptera ou Lepidoptera (Roignant et al., 2003). Estes estudos sugerem que o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) pode mediar a amplificação do sinal de silenciamento do RNA na ausência de RdRP em insetos (Schwarz et al., 2002). Lipardi e Paterson (Lipardi e Paterson, 2009) demonstraram que o gene *D-elp1*, em *D. melanogaster*, uma subunidade de RNA polimerase II, tem atividade de RdRP e está envolvida na imunidade via RNAi.

Adicionalmente, o sinal de silenciamento por RNAi é capaz de se movimentar intracelularmente em organismos eucariotos. Esta mobilidade do RNAi é observada em *C. elegans* (Voinnet e Baulcombe, 1997). Homólogos do gene *sid-1* (Systemic RNA interference deficient-1), que é responsável pela disseminação sistêmica de dsRNA no verme, foram identificados em *Bombyx mori* (Lepidoptera) e *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) e em outros insetos, como *Apis mellifera* (Hymenoptera), *T. castaneum* e afídeos, mas não no genoma de *D. melanogaster* (Winston et al., 2002; Xu e Han, 2008; Tian et al., 2009). Análises mais refinadas destas proteínas sid-1-like realizadas por Tomoyasu et al. (Tomoyasu et al., 2008) mostraram que estas são similares a outra proteína de *C. elegans* (tag-130) que não está envolvida no sistema de RNAi.

Devido à dificuldade de produção de insetos transgênicos ou mutantes, especificamente no caso de insetos de interesse econômico, a produção de uma resposta sistêmica de RNAi nestes organismos frequentemente requer a entrega de dsRNA à células e tecidos, via microinjeção. A microinjeção pode ser realizada nos embriões e na hemolinfa de insetos imaturos e maduros. Através de microinjeção diretamente realizada na hemolinfa da fêmea, ferramenta conhecida como RNAi parental, demonstrou-se sucesso na diminuição da expressão gênica, assim como alteração de fenótipo na progênie em *T. castaneum* (Bucher et al., 2002), *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) (Liu e Kaufman, 2004a; Liu e Kaufman, 2004b) e *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera) (Mito et al., 2008; Ronco et al., 2008). Para insetos modelo e não-modelo, a microinjeção direta de dsRNA é um método válido para atender a uma resposta sistêmica (Mito et al., 2011).

O uso de dsRNA para reprimir a expressão gênica e elucidar funções em insetos teve início em 1998 quando Kennerdell e Carthew (Kennerdell e Carthew, 1998) usaram RNAi para estudar os genes *frizzled* em *D. melanogaster*. Esta abordagem tem sido, desde então, utilizada com bastante sucesso na caracterização funcional de genes envolvidos numa série de processos fisiológicos em insetos, como desenvolvimento, alimentação, reprodução, comportamento e imunidade (Belles, 2010).

Além de estudos de genômica funcional, esta técnica tem chamado atenção em estudos para controle de pragas. Neste sentido, resultados recentes mostraram a viabilidade de plantas que produzem dsRNA na resistência contra insetos. Essas plantas transgênicas produziram dsRNA específicos contra genes essenciais no trato digestivo dos insetos causando mortalidade em 24 horas depois do contato com o RNAi (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Mais recentemente, foi também relatado o efeito de silenciamento de genes externos ao intestino por meio de dieta artificial (Tian et al., 2009), o que tem deixado os pesquisadores cada vez mais otimistas com relação ao controle de insetos pragas por meio de genes envolvidos em outros processos fisiológicos, além da digestão.

A especificidade do RNAi para fins inseticidas, entretanto, é uma consideração importante para o uso desta tecnologia em aplicações práticas. O uso desta técnica pode minimizar os efeitos sobre insetos não-alvo diante de uma análise minuciosa da sequência do gene a ser utilizada. Dentre outras vantagens, esta técnica permite o uso de apenas fragmentos de sequências de nucleotídeos, tendo em vista que a tradução de uma proteína não é necessária, o que minimiza as preocupações com biossegurança e alergenicidade, e poderá representar uma forma de controle provavelmente mais eficaz do que as atuais.

I.vi. Nematóide de galhas *Meloidogyne incognita*

Dentre os nematoides parasitas de plantas, os nematoides das galhas das raízes são os parasitas mais bem-sucedidos e contem as espécies mais danosas à agricultura mundial (Bird e Bird, 2001). Nematoides de galhas são classificados como endoparasitas sedentários obrigatórios, atacando uma grande variedade de

plantas hospedeiras. Dentre as espécies descritas até o momento, *Meloidogyne incognita* é considerada uma das espécies mais patogênicas do seu gênero e se reproduz por partenogênese mitótica (Abad et al., 2008). O ciclo de vida deste parasita inclui um período no solo, e um período parasítico nas raízes das plantas hospedeiras (Figura 8).

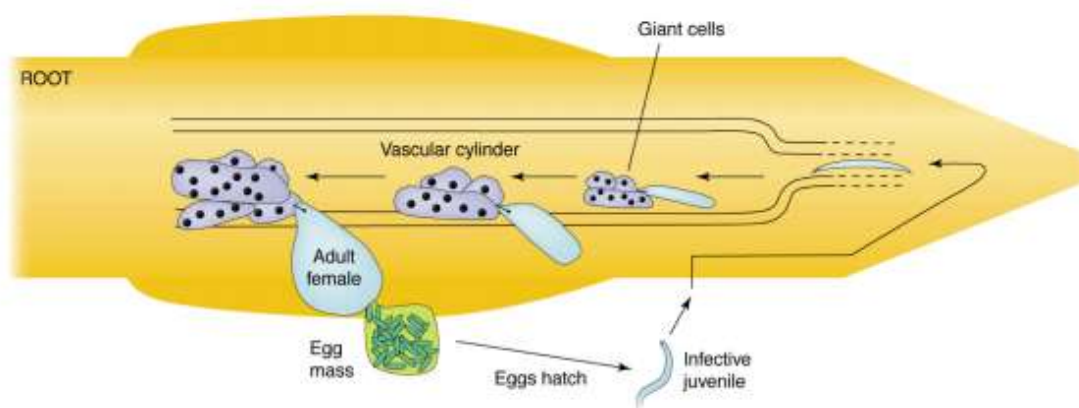


Figura 6. Representação esquemática do ciclo de vida do nematoide das galhas das raízes. Williamson e Gleason (2003).

As fêmeas adultas liberam os ovos numa matriz gelatinosa na superfície da raiz. Dentro do ovo, ocorre a embriogênese para o juvenil de primeiro estágio, que realiza muda para juvenis de segundo estágio (J2 infeccioso). Estes eclodem, movem-se no solo e são atraídos por raízes das plantas pelos exudados por ela liberados, invadindo a raiz na zona de alongação. No interior da raiz, os J2 penetram no tecido intercelularmente, migrando primeiro para a ponta da raiz e em seguida, subindo pelo cilindro vascular, onde estabelece seu sítio de alimentação. O sítio de alimentação deste nematoide é altamente especializado, contendo entre cinco e sete células gigantes (CGs) hipertrofiadas (Bird, 1962; Wyss et al., 1992). A formação da célula gigante, junto com a expansão e proliferação de células próximas do periciclo e córtex, resultam nas galhas. Estas CGs servem como a única fonte nutricional para o desenvolvimento e reprodução

do nematoide (Jones e Payne, 1978; Davis et al., 2004; Caillaud et al., 2008a). Uma vez estabelecido o sítio de alimentação, o J2 perde sua habilidade de se mover dentro da raiz e realiza mudanças significativas, como aumento da circunferência do corpo, seguido por três mudas até que se torne adulto (Triantaphyllou e Hirschmann, 1960). Fêmeas adultas assumem uma forma de pera e continuam a se alimentar até que libera entre 500 e 2000 ovos na matriz gelatinosa (Sijmons et al., 1994).

O dano na raiz e disfunção causadas pelas alterações na anatomia da raiz podem afetar a absorção de água pela raiz e supressão do crescimento e desenvolvimento da planta (Wilcox-Lee e Loria, 1987; Koenning et al., 2004). Redução da resistência estomatal e transpiração (Evans et al., 1975; Kirkpatrick et al., 1995) e sintomas de estresse por déficit hídrico após a infecção por estes nematoides também são documentadas (O'Bannon e Reynolds, 1965).

Tradicionalmente, o controle de nematoides em campo tem sido realizado utilizando variedades tolerantes, rotação de culturas e outras práticas culturais, além de nematicidas químicos. Entretanto, estes químicos são tóxicos ou voláteis, não-específicos e conhecidos por serem bastante danosos aos humanos e ao meio ambiente.

I.vii. Ciclo celular de plantas

Os mecanismos básicos que regulam a progressão do ciclo celular são bastante conservados entre os eucariotos (Nurse, 2002) e a conservação dos principais genes envolvidos no ciclo celular em plantas foi confirmado em estudos genômicos em *Arabidopsis*.

Um ciclo celular típico envolve quatro fases sequenciais, G1, S, G2 e M (Dewitte e Murray, 2003). Na fase G1, a célula aumenta de tamanho e integra os sinais relevantes que irão iniciar a fase S. Na fase S, o material genético é replicado, seguido pelo segundo intervalo, a fase G2. Durante a fase G2, a célula realiza a síntese de proteínas necessárias para montar a maquinaria que será utilizada na separação dos cromossomos durante a mitose. Em seguida, ocorre a

fase M, quando a mitose ocorre. O ciclo celular então, finaliza com a citocinese e duas células filhas formadas (Dewitte e Murray, 2003; Inzé e De Veylder, 2006).

A progressão do ciclo celular em plantas é controlada por complexos conservados formados por quinases dependentes de ciclina (CDKs) e suas subunidades de ciclina regulatórias (CYCs), que são necessárias para corrigir e ordenar os eventos críticos do ciclo celular (Inzé e De Veylder, 2006). Em *Arabidopsis thaliana* foram descritos mais de 100 genes do core do ciclo celular (Van Leene et al., 2010). Entretanto, a composição e função dos complexos estabelecidos por estes components durante as fases de divisão celular ainda estão sendo estudados (Van Leene et al., 2010; Van Leene et al., 2011).

O CDK primário envolvido no ciclo celular é o CDKA, que exerce um papel importante nas transições entre G1/S e G2/M (Hemerly et al., 1995; Inzé e De Veylder, 2006). Outra classe importante de reguladores é a CDKB (Segers et al., 1996; Boudolf et al., 2004; Inzé e De Veylder, 2006).

Uma grande família de ciclinas foi descrita em plantas. No entanto, apenas três ciclinas (tipos-A, -B e -D) foram relatadas com papel na regulação do ciclo celular (Vandepoele et al., 2002; Inzé e De Veylder, 2006). As ciclinas determinam modificações conformacionais no sítio catalítico de CDK, bem como são responsáveis pela seleção do substrato, localização subcelular e estabilidade nos complexos CDK/CYC. Ciclinas do tipo A (CYCA) geralmente aparecem no início da fase S e estão envolvidas na progressão desta fase, sendo destruídas na transição G2/M (Menges et al., 2005). As ciclinas do tipo B (CYCB) mostram uma regulação comum, com um pico durante G2 e início da mitose. Estas são controladoras da transição G2/M durante o ciclo celular (Vandepoele et al., 2002).

A ligação entre ciclina e CDK é normalmente um pré-requisito para a atividade de CDK. CDKs são geralmente expressas estavelmente durante o ciclo celular, e a expressão das ciclinas é periódica e limita a atividade de quinase das CDKs a períodos específicos da progressão do ciclo celular (Inzé e De Veylder, 2006; Francis, 2007). Vias distintas estão envolvidas na regulação da disponibilidade dos components do ciclo celular. Os complexos CDK/CYC fosforilam um número de substratos, que dão início à transição de uma fase a

outra do ciclo celular (Gutierrez, 2009). A atividade destes complexos é regulada pela fosforilação e desfosforilação, e à interação com proteínas regulatórias.

Um nível importante de regulação ocorre através da ativação da ação de proteínas inibidoras de CDKs de plantas (CKIs). As CKIs controlam a progressão do ciclo celular e, recentemente, duas famílias foram descritas em *Arabidopsis*. A primeira é composta por proteínas que inibem ou interagem com quinases dependentes de ciclina (ICKs), ou “Kip-Related Proteins (KRPs), atualmente referidas como família ICK/KRP (Wang et al., 1997; Lui et al., 2000; De Veylder et al., 2001). A segunda família de inibidores específicos do ciclo celular de plantas envolve proteínas SIAMESE (SIM) proteínas relacionadas a SIAMESE (SMR). Apesar de distantes de ICK/KRPs, os genes que codificam estas proteínas compartilham um motivo de ligação à ciclina e interagem tanto com CDKA como ciclinas do tipo D (Churchman et al., 2006; Peres et al., 2007).

I.ix. Ciclo de endoreduplicação

O ciclo de endoreduplicação é um variante do ciclo celular mitótico padrão, no qual ocorrem fases S e G sem a fase M, resultando num aumento exponencial dos níveis de ploidia da célula. Por consequência, parte do controle molecular existente no ciclo celular padrão é também conservado no endociclo (Joubés e Chevalier, 2000; Edgar e Orr-Weaver, 2001). Endociclos repetidos são frequentemente relacionados ao aumento da célula, ocorrendo devido ao aumento da atividade metabólica ou em células altamente especializadas. A endoreduplicação por controlar vários processos, como diferenciação celular, expansão celular, atividade metabólica e sobrevivência (De Veylder et al., 2011). O endociclo também parece ter um papel crucial no crescimento e desenvolvimento de alguns simbioses ou patógenos de plantas, fornecendo para estes, os nutrientes necessários para seu desenvolvimento (Wildermuth, 2010).

A nível molecular, o início da endoreduplicação coincide com a perda dos reguladores mitóticos e, normalmente, células endoreduplicadas não re-entram em ciclos celulares mitóticos (Inzé e De Veylder, 2006). Um dos principais componentes desta mudança para endoreduplicação é a redução da atividade do

complexo CDK/CYC a níveis em que ocorre a falha da entrada na mitose, e onde ocorrem rounds sucessivos de replicação do material genético (Gutierrez, 2009; De Veylder et al., 2011). Diferentes mecanismos podem regular a atividade de CDK e estar envolvidos na mudança para o endociclo (Larkins et al., 2001; Sugimoto-Shirasu e Roberts, 2003; De Veylder et al., 2011).

Proteínas inibidoras de CDK (CKIs) tem um papel implicado na regulação do endociclo. Enquanto que os genes da família SIAMESE (SIM) participam da repressão da atividade mitótica de CDK, membros da família ICK/KRP parecem atuar como candidatos a dirigir os ciclos oscilantes de atividade de CDKA durante a transição G2-M e na fase S (De Veylder et al., 2011).

I.ix. Proteínas inibidoras de ciclina quinase – ICK/KRPs

Proteínas inibidoras de ciclina quinase desempenham papéis chave no ciclo celular eucariótico, se ligando ou inibindo a atividade de CDKs das fases S e M (Morgan, 1997). Os sete genes descritos em mamíferos fazem parte de duas famílias de proteínas de acordo com similaridades estruturais e funcionais em plantas.

A nível transcriptional, sete membros da família KRP de *Arabidopsis* foram observados em diferentes estudos (Lui et al., 2000; De Veylder et al., 2001; Jasinski et al., 2002; Ormenese et al., 2004; Pettko-Szandtner et al., 2006; de Almeida et al., 2009). Todos os membros desta família mostra níveis de expressão moderados em *Arabidopsis*, e variações temporais e espaciais no padrão de expressão durante a progressão do ciclo celular e desenvolvimento da planta, sugerindo apresentarem funções distintas (Ormenese et al., 2004; Menges et al., 2005; de Almeida Engler et al., 2009; Torres Acosta et al., 2011). A regulação de alguns genes *KRP* podem ser feita por hormônios ou em resposta a fatores ambientais. Por exemplo, *KRP1* de *Arabidopsis* parece ser induzido pelo ácido abscísico (Kang et al., 2002), temperatura (Wang et al., 1998) e estresse salino (Ruggiero et al., 2004), enquanto que *KRP2* é suprimido por auxina (Richard et al., 2001).

Apesar dos estudos realizados, pouco se sabe a respeito das funções e efeitos fisiológicos específicos das proteínas KRP em plantas. Mutações simples nos genes *KRP* resultando em perda de função aparentemente não produzem qualquer fenótipo. Entretanto, o silenciamento múltiplo de genes *KRP* leva a planta a apresentar hiperproliferação celular (Anzola et al., 2010). Além disto, recentemente foi demonstrado por Sanz et al. (2011) que mutantes *krp2* apresentam aumento do número de raízes laterais.

Por outro lado, todos os resultados sobre os efeitos dos KRPs tem sido obtidos pela superexpressão transgênica ou *knockout* em *Arabidopsis*. Maior parte das analyses funcionais foram realizadas com KRP1 e KRP2 de *Arabidopsis* (Wang et al., 2000; De Veylder et al., 2001; Schnittger et al., 2003; Zhou et al., 2003; Verkest et al., 2005; Weini et al., 2005; Jakoby et al., 2006; Roeder et al., 2010; Sanz et al., 2011). Em *Arabidopsis*, foram observados profundos efeitos em plantas com alta superexpressão de KRP1, KRP2, KRP6, ou KRP7 dirigidos pelo promotor CaMV 35S, como serem plantas anãs e apresentarem folhas serreadas e largas (Wang et al., 2000; De Veylder et al., 2001; Zhou et al., 2002; Anzola et al., 2010).

I.x. Referências

- 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., Hamamouch, 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., Ségurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., van Ghelder, C., Veronico, P., Baum, T.J., Blaxter, M., Bleve-Zacheo, T., Davis, E.L., Ewbank, J.J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J.T., Laudet, V., Maule, A.G., Quesneville, H., Rosso, M.N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J., and Wincker, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26:909-915.
- Adams, T.S., and Filipi, P.A. 1983. Vitellin and vitellogenin concentrations during oogenesis in the first gonotrophic cycle of the house fly, *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology* 29:723-733.
- Anzola, J.M., Sieberer, T., Ortbauer, M., Butt, H., Korbei, B., Weinhofer, I., Müllner, A.E., and Luschnig, C. 2010. Putative *Arabidopsis* transcriptional

- adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 107: 10308-10313.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros, M.N., Silva-Neto, M.A.C., and Masuda, H. 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77:405-430.
- Avellar, S.O.C., and Vilela, P.S. 2006. Evolução do número de pessoas ocupadas na agropecuária brasileira no período de 1990 a 2004. *Revista Política Agrícola*:4-8.
- Barbosa, S., Sobrinho, R.B., and Campanhola, C. 1986. O bicudo do algodoeiro no Brasil: ocorrência, distribuição geográfica e medidas de erradicação propostas. Pages 7 - 29 in: *O bicudo do Algodoeiro* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, Mansfield, S.W., Morris, J. W., Murillo J., C. E., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Embrapa - DDT. Documentos.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., and Roberts, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25:1322-1326.
- Bebas, P., Kotwica, J., Joachimiak, E., and Giebultowicz, J.M. 2008. Yolk protein is expressed in the insect testis and interacts with sperm. *BMC Developmental Biology* 8.
- Beenackers, A.M.T., van der Horst, D.J., and van Marrewijk, W.J.A. 1981. Role of lipids in energy metabolism. Pages 53-100 in: *Energy Metabolism in Insects* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Plenum Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Bellés, X. 1998. Endocrine effectors in insect vitellogenesis. Pages 71-90 in: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Cambridge University Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Bellés, X. 2005. Vitellogenesis directed by juvenile hormone. Pages 157-197 in: *Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Science Publishers Inc.s, Dordrecht, The Netherlands.
- Bellés, X. 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects. *Annual Review of Entomology* 55:111-128.
- Bellés, X., Martin, D., and Piulachs, M.D. 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology* 50:181-199.
- Bird, A.F. 1962. The inducement of giant cells by *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 8:1-10.
- Bird, D.M., and Bird, A. 2001. Plant-parasitic nematodes. In: Kennedy, M.W., Harnett, W. (eds) *Parasitic nematodes*. CAB International: Wallingford, UK 139–166.

- Boggs, C.L. 1990. A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. *The American Naturalist* 136:598-617.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T.S., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Vand Der Schueren, E., Inzé, D. and De Veylder, L. 2004. The plant-specific Cyclin-Dependent Kinase CDKB1; and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 2683–2692.
- Brown, S., Holtzman, S., Kaufman, T., and Denell, R. 1999. Characterization of the *Tribolium* Deformed ortholog and its ability to directly regulate Deformed target genes in the rescue of a *Drosophila* Deformed null mutant. *Development Genes and Evolution* 209:389-398.
- Brown, S.J., Parrish, J.K., Denell, R.E., and Beeman, R.W. 1994. Genetic control of early embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, *American Zoology* 34:343–352.
- Bucher, G., Scholten, J., and Klingler, M. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology* 12:R85-86.
- Caillaud, M.C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida Engler, J., Abad, P., Rosso, M.N., and Favery, B., 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165:104-113.
- Carlini, C.R., and Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.
- Carter, F.L., Nelson, T.C., Jordan, A.G., and Smith, J.R. 2001. U.S. cotton declares war on the cotton boll weevil. Pages 24-54 in: *Boll weevil eradication in the United States through 1999*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic The Cotton Foundation Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Chen, J.S., Sappington, T.W., and Raikhel, A.S. 1997. Extensive Sequence Conservation Among Insect, Nematode, and Vertebrate Vitellogenins Reveals Ancient Common Ancestry. *Journal of Molecular Evolution* 44:440-451.
- Churchman, M.L., Brown, M.L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J.D., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Gwin, T., Churchman, J., and Larkin, J.C. 2006. SIAMESE, a novel plant-specific cell cycle regulator controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18: 3145-3157.
- Colonello-Frattini, N.A., Guidugli-Lazzarini, K.R., Simoes, Z.L.P., and Hartfelder, K. 2010. Mars is close to venus - Female reproductive proteins are expressed in the fat body and reproductive tract of honey bee (*Apis mellifera* L.) drones. *Journal of Insect Physiology* 56:1638-1644.
- Contini, E., Gasques, J.G., Leonardi, R.B.D.A., and Bastos, E.T. 2006. Evolução recente e tendências do agronegócio. *Revista de Política Agrícola* 15:5-28.
- Davis, E.L., Hussey, R.S., and Baum, T.J. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20:134-141.
- de Almeida Engler, J., De Veylder, L., De Groot, R., Rombauts, S., Boudolf, V., De Meyer, B., Hemerly, A., Ferreira, P., Beeckman, T., Karimi, M., Inzé, D.,

- and Engler, G. 2009. Systematic analysis of cell cycle gene expression during Arabidopsis development. *Plant Journal* 59: 645-660.
- de Kort, C.A.D., and Granger, N.A. 1996. Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 33:1-26.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krois, L., Terras, F., Landrieu, I., Van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inzé, D. 2001 Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *The Plant Cell* 13: 1653-1667.
- De Veylder, L., Larkin, J.C., and Schnittger, A. 2011. Molecular control and function of endoreduplication in development and physiology. *Trends in Plant Science* 16: 1360-1385.
- Delbecque, J.P., Weidner, K., and Hoffmann, K.H. 1990. Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invertebrate Reproduction & Development* 18:29-42.
- della-Cioppa, G., and Engelmann, F. 1987. The vitellogenin of *Leucophaea maderae*: Synthesis as a large phosphorylated precursor. *Insect Biochemistry* 17:401-415.
- Dewitte, W., Murray, J.A. 2003. The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54:235-264.
- Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105: 297-306.
- El-Lissy, O.A., and Grefenstette, W.J. 2006. Progress of boll weevil eradication in the U.S. In *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences* (San Antonio, TX), pp. 1266-1276.
- El Naggat, S.E.M., Mohamed, H.F., and Mahmoud E.A. 2010. Studies on the morphology and histology of the ovary of red palm weevil female irradiated with gamma rays. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 13: 9-16.
- Evans, K., Parkinson, K. J., and Trudgill, D. L. 1975. Effects of potato cyst nematodes on potato plants. III. Effects on the water relations and growth of a resistant and a susceptible variety. *Nematologica* 21:273-280.
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S.W., and Moerman, D.G. 1991. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113:503-514.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Francis D. 2007. The plant cell cycle-15 years on. *New Phytologist* 174:261-278.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti-Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.L., and Omoto, C. 2002. *Entomologia Agrícola*. FEALQ, Piracicaba.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A., and Roe, R.M. 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:617-644.
- Giorgi, F., Snigirevskaya, E.S., and Raikhel, A.S. 2005. The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion. Pages 33-68 in: *Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates* N. S. Iacobellis,

- Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Science Publishers, Inc.s, Dordrecht, The Netherlands.
- Gordon, K.H., and Waterhouse, P.M. 2007. RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology* 25:1231-1232.
- Gueldner, R.C., Tumlinson, J.H., Hardee, D.D., Thompson, A.C., Hedin, P.A., and Minyard, J.P. 1971. Identification and synthesis of the four compounds comprising the boll weevil sex attractant. *The Journal of Organic Chemistry* 36:2616-2621.
- Guo, S., and Kempfues, K.J. 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620.
- Gutierrez, C. 2009. The Arabidopsis Cell Division Cycle. *The Arabidopsis book* 7:e0120.
- Hagedorn, H. 1985. The role of ecdysteroids in reproduction. Pages 205-261 in: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Pergamon Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Hagedorn, H.H., O'Connor, J.D., Fuchs, M.S., Sage, B., Schlaeger, D.A., and Bohm, M.K. 1975. The ovary as a source of alpha-ecdysone in an adult mosquito. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72:3255-3259.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
- Hammock, B.D. 1985. Regulation of juvenile hormone titre: degradation. Pages 431-472 in: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Pergamon Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Haq, S.K., Atif, S.M., and Khan, R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431:145-159.
- Hardee, D.D., Cross, W.H., and Mitchell, E.B. 1969. Male boll weevils are more attractive than cotton plants to boll weevils. *Journal of Economic Entomology* 62:165-169.
- Haynes, J.W., and Smith, J.W. 1992. Longevity of laboratory reared boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) offered honey bee collected pollen and plants unrelated to cotton. *Journal of Entomological Science* 27:366-374.
- Hemerly, A., de Almeida Engler, J., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D., and Ferreira, P. 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO Journal* 14:3925-3936.
- Hughes, C.L., and Kaufman, T.C. 2000. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development* 127:3683-3694.

- Inzé, D., De Veylder, L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. Annual Review of Genetics 40:77-105.
- Izumi, S., Yano, K., Yamamoto, Y., and Takahashi, S.Y. 1994. Yolk proteins from insect eggs: Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. Journal of Insect Physiology 40:735-746.
- Jakoby, M.J., Weini, C., Pusch, S., Kuijt, S.J., Merkle, T., Dissmeyer, N., and Schnittger, A. 2006. Analysis of the subcellular localization, function, and proteolytic control of the Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1. Plant Physiology 141: 1293-12305.
- Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C., and Glab, N. 2002. Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. Plant Physiology 130: 1871-1882.
- Jones, M.G.K., and Payne, H.L. 1978. Early stages of nematode-induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. Journal of Nematology 10:70-84.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, Q., and 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 31:957-973.
- Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y., and Kim, S.Y. 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. Plant Cell 14: 343-357.
- Katoch, R., and Thakur, N. 2013. Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants. Applied Biochemistry and Biotechnology 169:1579-1605.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. 1998. Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* Act in the Wingless Pathway. Cell 95:1017-1026.
- Kim, K.S., Szendrei, Z., Rodriguez-Saona, C., Mulder, P.G., Jr., and Sappington, T.W. 2009. Molecular diagnostic for boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) based on amplification of three species-specific microsatellites. Journal of Economic Entomology 102:759-766.
- Kinjoh, T., Kaneko, Y., Itoyama, K., Mita, K., Hiruma, K., and Shinoda, T. 2007. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37:808-818.
- Kirkpatrick, T. L., Van Iersel, M. W., and Oosterhuis, D. M. 1995. Influence of *Meloidogyne incognita* on the water relations of cotton grown in microplots. Journal of Nematology 27:465–471.
- Klowden, M.J. 2007. Physiological Systems in Insects. Elsevier, London.
- Kozlova, T., and Thummel, C.S. 2000. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. Trends in Endocrinology & Metabolism 11:276-280.
- Koenning, S. R., Wrather, J. A., Kirkpatrick, T. L., Walker, N. R., Starr, J. L., and Mueller, J. D. 2004. Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: Old and emerging production challenges. Plant Disease 88:100–113.

- Krause, D. 1939. Die eitypen der insekten. *Biologisches Zentralblatt*. 59:495–536.
- Kurscheid, S., Lew-Tabor, A.E., Rodriguez Valle, M., Bruyeres, A.G., Doogan, V.J., Munderloh, U.G., Guerrero, F.D., Barrero, R.A., and Bellgard, M.I. 2009. Evidence of a tick RNAi pathway by comparative genomics and reverse genetics screen of targets with known loss-of-function phenotypes in *Drosophila*. *BMC Molecular Biology* 10:26.
- Larkins, B.A., Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C.M., Woo, Y.M., and Liu, Y. 2001. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* 52: 183-192.
- Lee, J.M., Nishimori, Y., Hatakeyama, M., Bae, T.W., and Oishi, K. 2000. Vitellogenin of the cicada *Graptopsaltria nigrofusca* (Homoptera): analysis of its primary structure. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:1-7.
- Lipardi, C., and Paterson, B.M. 2009. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:15645-15650.
- Lipardi, C., Wei, Q., and Paterson, B.M. 2001. RNAi as Random Degradative PCR: siRNA Primers Convert mRNA into dsRNAs that Are Degraded to Generate New siRNAs. *Cell* 107:297-307.
- Liu, P., and Kaufman, T. 2004a. Hunchback is required for suppression of abdominal identity, and for proper germ band growth and segmentation in the intermediate germ band insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development* 131:1515-1527.
- Liu, P.Z., and Kaufman, T.C. 2004b. Kruppel is a gap gene in the intermediate germ band insect *Oncopeltus fasciatus* and is required for development of both blastoderm and germ band-derived segments. *Development* 131:4567-4579.
- Liu, P.Z., and Kaufman, T.C. 2005. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode, *Evolution Development* 7:629–646.
- Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L.C., Crosby, W.L., and Fobert, P.R. 2000. The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J.* 21: 379-385.
- Maderspacher, F., Bucher, G., and Klingler, M. 1998. Pair-rule and gap gene mutants in the flour beetle *Tribolium castaneum*, *Development Genes Evolution* 208: 558–568.
- Mahon, R.J., and Olsen, K.M. 2009. Limited Survival of a Cry2Ab-Resistant Strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bollgard II. *Journal of Economic Entomology* 102:708-716.
- Mao, Y.B., Cai, W.J., Wang, J.W., Hong, G.J., Tao, X.Y., Wang, L.J., Huang, Y.P., and Chen, X.Y. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* 25:1307-1313.
- Mazzini, M., Burrini, A., and Giorgi, F. 1989. The secretory pathway of vitellogenin in the fat body of the stick insect *Bacillus rossius*: An ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell* 21:589-604.

- McGregor, D.A., and Loughton, B.G. 1977. Amino acid composition, degradation and utilization of locust vitellogenin during embryogenesis. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* 181:113-122.
- Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W., and Murray, J.A.H. 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal* 41: 546-566.
- Mito, T., Nakamura, T., Bando, T., Ohuchi, H., and Noji, S. 2011. The advent of RNA interference in Entomology. *Entomological Science* 14:1-8.
- Mito, T., Ronco, M., Uda, T., Nakamura, T., Ohuchi, H., and Noji, S. 2008. Divergent and conserved roles of extradenticle in body segmentation and appendage formation, respectively, in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Developmental Biology* 313:67-79.
- Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinase: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 261-291.
- Morton, R.L., Schroeder, H.E., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J., Armstrong, E., and Higgins, T.J. 2000. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:3820-3825.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 2:279–289.
- Nation, J.L. 2008. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, New York.
- Nijhout, H.F. 1994. *Insect hormones*. Princeton University Press, New Jersey.
- Nurse, P. 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Bioscience Reports* 22:487-499.
- O'Bannon, J. H., and Reynolds, H. W. 1965. Water consumption and growth of root-knot nematode-infected and uninfected cotton plants. *Soil Science* 99:251–255.
- Obbard, D.J., Gordon, K.H., Buck, A.H., and Jiggins, F.M. 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:99-115.
- Ormenese, S., de Almeida Engler, J., de Groot, R., de Veylder, L., Inzé, D., and Jacquemard, A. 2004. Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 93: 575-580.
- Pak, J., and Fire, A. 2007. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315:241-244.
- Peres, A., Churchman, M.L., Hariharan, S., Himanen, K., Verkest, A., Vandepoele, K., Magyar, Z., Hatzfeld, Y., Van Der Schueren, E., Beemster, G.T.S., Frankard, V., Larkin, J.C., Inzé, F., and De Veylder, L. 2007. Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *Journal of Biological Chemistry* 282: 25588-25596.

- Pettko-Szandtner, A., Meszaros, T., Horvath, G.V., Bakó, L., Csordás-Tóth, E., Blastyák, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P., and Dudits, D. 2006. Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant Journal* 46: 111-123.
- Postlethweit, J.H., and Giorgi, F. 1985. Vitellogenesis in insects. Pages 85-126 in: *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Plenum Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Raikhel, A.S. 1984. The accumulative pathway of vitellogenin in the mosquito oocyte: a high-resolution immuno- and cytochemical study. *Journal of Ultrastructure Research* 87:285-302.
- Raikhel, A.S. 1987. Monoclonal antibodies as probes for processing of the mosquito yolk protein; a high-resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways. *Tissue and Cell* 19:515-529.
- Raikhel, A.S., and Dhadialla, T.S. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology* 37:217-251.
- Raikhel, A.S., Brown, M.R., and Bellés, X. 2004. Hormonal control of reproductive processes. Pages 433-491 in: *Comprehensive Molecular Insect Science*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Elseviers, Dordrecht, The Netherlands.
- Rajaratnam, V.S. 1996. Isolation, characterization and complete nucleotide sequence of a *Galleria mellonella* cDNA coding for the follicle cell-specific yolk protein, YP4. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26:545-555.
- Redfern, C.P.F. 1989. Ecdysiosynthetic tissues. Pages 182-187 in: *Ecdysone*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Georg Thieme-Verlags, Dordrecht, The Netherlands.
- Rees, H.H. 1985. Biosynthesis of ecdysone. Pages 249-293 in: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Pergamon Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Richard, C., Granier, C., Inzé, D., and De Veylder, L. 2001. Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *Journal of Experimental Botany* 52: 1625-1633.
- Riddiford, L.M. 1993. *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Roe, R.M., and Venkatesh, K. 1990. Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. Pages 126-179 in: *Morphogenetic hormones of arthropods*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic University Presss, Dordrecht, The Netherlands.
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., and Meyerowitz, E.M. 2010. Variability in the control of cell division underlies

- sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Biology* 8: e1000367.
- Roignant, J.Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.A., and Antoniewski, C. 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA* 9:299-308.
- Ronco, M., Uda, T., Mito, T., Minelli, A., Noji, S., and Klingler, M. 2008. Antenna and all gnathal appendages are similarly transformed by homothorax knock-down in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Developmental biology* 313:80-92.
- Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T.M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., and Magio, A. 2004. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 3134-3147.
- Santos, R.F., and Santos, J.W. 1997. Crise na cadeia produtiva do algodão. *Revista de Oleaginosas e Fibras* 1:25-36.
- Sanz, L., Dewitte, W., Forzani, C., Patell, F., Nieuwland, J., Wen, B., Quelhas, P., De Jaer, S., Titmus, C., Campilho, A., Ren, H., Estelle, M., Wang, H., and Murray, J.A. 2011. The *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD2 ;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *Plant Cell* 23: 1-20.
- Sappington, T.W., and Raikhel, A.S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28:277-300.
- Sappington, T.W., and Spurgeon, D.W. 2000. Variation in Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Captures in Pheromone Traps Arising from Wind Speed Moderation by Brush Lines. *Environmental Entomology* 29:807-814.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D. 2002. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Molecular Cell* 10:537-548.
- Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schöbinger, U., and Hülskamp, M. 2003. Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1 in single-celled *Arabidopsis* trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell* 15: 303–315
- Schwedes, C.C., and Carney, G.E. 2012. Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 58:293-302.
- Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., de Almeida Engler, J., Jacquard, A., Van Montagu, M., and Inzé, D. 1996. The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant Journal* 10: 601-612.
- Shirk, P.D., Minoo, P., and Postlethweit, J.H. 1983. 20-Hydroxyecdysone stimulates the accumulation of translational yolk polypeptide gene transcript in adult male *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80:186-190.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., and Plasterk, R.H. 2007. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315:244-247.

- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-476.
- Sijmons, P.C., Atkinson, H.J., and Wyss, U. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology* 32: 235-259.
- Smith, J.W. 1998. Boll Weevil Eradication: Area-Wide Pest Management. *Annals of the Entomological Society of America* 91:239-247.
- Snigirevskaya, E.S., Hays, A.R., and Raikhel, A.S. 1997a. Secretary and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell and Tissue Research* 290:129-142.
- Snigirevskaya, E.S., Hays, A.R., and Raikhel, A.S. 1997b. Secretary and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell and tissue research* 290:129-142.
- Sommer, R., Tautz, D. 1991. Segmentation gene expression in the house fly *Musca domestica*. *Development* 113:419–430.
- Spradling, A.C. 1993. Developmental genetics of oogenesis, in: Bate, M., Martinez, A. (Eds.), *The Development of Drosophila melanogaster*, I, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, pp. 1–70.
- Spurgeon, D.W. 2003. Age Dependence of Pheromone Production by the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 32:31-38.
- Spurgeon, D.W., and Raulston, J.R. 2006. Captures of boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) in traps associated with different habitats. *Journal of Economic Entomology* 99:752-756.
- Steele, J.E. 1981. The role of carbohydrate metabolism in physiological function. Pages 101-134 in: *Energy in Metabolism in Insects* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Plenum Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Sugimoto-Shirasu, K., and Roberts, K. 2003. “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 544-553.
- Sulston, I.A., and Anderson, K.V. 1996. Embryonic patterning mutants of *Tribolium castaneum*, *Development* 122:805–814.
- Swiatek, P., and Klag, J. 1997. The differentiation of gonads in *Anthonomus grandis* (L.) (Coleopter: Curculionidae) larvae. *International Journal of Insect Morphology & Embryology* 26: 55-61.
- Taub-Montemayor, T.E., and Rankin, M.A. 1997. Regulation of vitellogenin synthesis and uptake in the boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Physiological Entomology* 22:261-268.
- Tian, H.G., Peng, H., Yao, Q., Chen, H.X., Xie, Q., Tang, B., and Zhang, W.Q. 2009. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. *Plos One* 4.
- Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., and Bucher, G. 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology* 9.

- Torres Acosta, J.A., Fowke, L.C., and Wang, H. 2011. Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Annals of Botany* 107: 1141-1157.
- Triantaphyllou, A.C., and Hirschmann, H. 1960. Post infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949. *Annales de L'Institute Phytopathologique Benaki* 3:1-11.
- Triplehorn, C.A., and Johnson, N.F. 2011. *Estudos dos Insetos*. Cengage Learning, São Paulo.
- Tufail, M., and Takeda, M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology* 54:1447-1458.
- Tufail, M., Raikhel, A.S., and Takeda, M. 2005. Biosynthesis and processing of insect vitellogenins. Pages 1-32 in: *Progress in Vitellogenesis. Reproductive Biology of Invertebrates* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Science Publishers, Inc.s, Dordrecht, The Netherlands.
- Vandepoole, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inzé, D. 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 903-916.
- Van Antwerpen, R., Pham, D.Q.D., and Ziegler, R. 2005. Accumulation of lipids in insect oocytes. Pages 265-287 in: *Reproductive Biology of Invertebrates. Progress in Vitellogenesis* N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Science Publishers, Inc.s, Dordrecht, The Netherlands.
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., and Stuitje, A.R. 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell* 2:291-299.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., et al. 2010. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 6:397.
- Van Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., et al. 2011. A kaleidoscopic view of the *Arabidopsis* core cell cycle interactome. *Trends in Plant Science* 16:141-150.
- Verkest, A., Weinel, C., Inzé, D., De Veylder, L., and Schnittger, A. 2005. Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiology* 139: 1099-1106.
- Voinnet, O., and Baulcombe, D.C. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389:553.
- Wang, H., Fowke, L.C., and Crosby, W.L. 1997. A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* 386: 451-452.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L.C. 2000. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *The Plant Journal* 24: 613-623.
- Weinel, C., Marquardt, S., Kuijt, S.J., Nowack, M.K., Jacoby, M.J., Hülskamp, M., and Schnittger, A. 2005. Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* 17: 1704-1722.

- Wheeler, D. 1996. The role of nourishment in oogenesis. *Annual Review of Entomology* 41:407-431.
- Wilcox-Lee, D. A., and Loria, R. 1987. Effects of nematode parasitism on plant-water relations. In: J. A. Veech and D. W. Dickson, eds. *Vistas on nematology*. Society of Nematologists: Hyattsville, MD. Pp. 260–266.
- Wildermuth, M.C. 2010. Modulation of host nuclear ploidy: a common plant biotroph mechanism. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 1-10.
- Williamson, V.M., and Gleason, C.A. 2003. Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6:327-333.
- Winston, W.M., Molodowitch, C., and Hunter, C.P. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295:2456-2459.
- Wyatt, G.R. 1991. Gene Regulation in Insect Reproduction. *Invertebrate Reproduction & Development* 20:1-35.
- Wyatt, G.R., and Davey, K.G. 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormones in adult insects. *Advances in Insect Physiology* 26:1-155.
- Wyss, U., Grundler, F., and Münch, A. 1992. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38:98-111.
- Xu, W., and Han, Z. 2008. Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. *Journal of Insect Science* 8:1-6.
- Zhou, Y., Fowke, L.C., and Wang, H. 2002. Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* 20: 967-975.
- Zhou, Y., Li, G., Brandizzi, F., Fowke, L.C., and Wang, H. 2003. The plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for in vivo kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *The Plant Journal* 35: 476-489.

II – HIPÓTESES

- O silenciamento gênico da vitelogenina interfere na reprodução de *Anthonomus grandis*
- Proteínas inibidoras do ciclo celular de plantas afetam o ciclo de vida do nematoide *Meloidogyne incognita*.

III – JUSTIFICATIVA

Anthonomus grandis é um inseto de grande importância fitossanitária para a cotonicultura no Brasil, no entanto pouco se sabe a respeito de sua fisiologia ou regulação gênica de processos fisiológicos importantes para sua manutenção no ambiente. Neste sentido, a tecnologia do RNA interferente é uma ferramenta recentemente descoberta e na atualidade, amplamente utilizada para estudos de genômica funcional, visando o conhecimento mais aprofundado a respeito de regulação e expressão gênica. O nematoide de galhas de raízes também é uma praga de grande importância por ser um patógeno polífago (que se alimenta de várias espécies vegetais cultivadas). Ele se alimenta de células das raízes de plantas cultivadas estimulando a formação de tumores pela regulação do ciclo celular das células hospedeiras. Assim, o estudo de proteínas envolvidas na inibição do ciclo celular são de grande importância para a construção de ferramentas que possam nos ajudar a controlar este patógeno. Os estudos aqui realizados são importantes, tanto para a ciência básica, como para aplicação biotecnológica no controle de pragas. Em relação a *A. grandis*, sabe-se que a vitelogenina é uma importante glicolipoproteína essencial para o desenvolvimento embrionário dos insetos. Foram realizados estudos demonstrando a síntese e captura de Vtg em *A. grandis* (Taub-Montemayor and Rankin, 1997), no entanto, não existem dados que demonstrem qual o impacto da redução dos níveis desta proteína no sucesso reprodutivo deste inseto. No caso do nematoide *M. incognita*, algumas proteínas inibidoras do ciclo celular de *Arabidopsis thaliana* (KRPs) foram validadas possuindo efeito negativo no ciclo de vida deste nematoide. Apenas o KRP3, KRP5 e KRP7, alvos do presente trabalho, ainda não foram estudados até o momento. Este conhecimento é de grande relevância científica tendo em vista a compreensão mais minuciosa dos processos nos quais estas

proteínas estão envolvidas em geral, assim como na identificação de moléculas para o uso no controle de *A. grandis* e *M. incognita*.

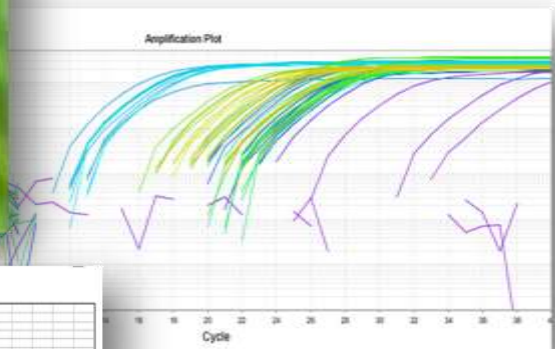
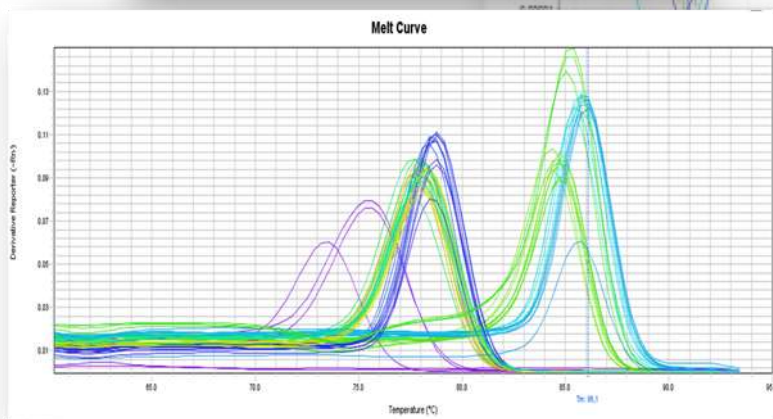
IV – OBJETIVOS

- Estudar a importância da vitelogenina na reprodução do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Para isto, inicialmente foi necessária a determinação de genes referência para estudos com este inseto.

- Realizar análise funcional de três genes inibidores do ciclo celular, ou seja, *KRP3*, *KRP5* e *KRP7*, de *Arabidopsis thaliana* infectada pelo nematoide das galhas de raízes, *Meloidogyne incognita*.

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE GENES REFERÊNCIA PARA NORMALIZAÇÃO DA PCR QUANTITATIVA EM ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE DIFERENTES TECIDOS DE *Anthonomus grandis*



Resumo

A técnica de PCR quantitativa tem sido largamente utilizada em estudos de análise de expressão gênica. Entretanto, para se obter resultados confiáveis, deve-se proceder uma normalização apropriada dos dados com genes referência que devem ser estabelecidos de acordo com a condição experimental. Atualmente, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco de dados de sequência de transcrito de *Anthonomus grandis*, que é a principal praga do algodoeiro. Desta forma, é necessária a avaliação de estabilidade dos genes constitutivos deste inseto com o objetivo de auxiliar na escolha de genes referência adequados para a normalização de qRT-PCR com este inseto em estudos futuros. Para isto, foram selecionados nove genes constitutivos: arginina quinase (ArgK), β -actina (B-ACT), β -tubulina (B-TUB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongação alfa 1 (EF1A), ubiquitina (UBQ) e proteínas ribossomais S3, S11 S26 (RPS3, RPS11 e RPS26, respectivamente) e desenhados *primers* para a análise de estabilidade. A análise de estabilidade dos genes escolhidos foi realizada em diferentes tecidos de larvas e adultos do inseto. Na fase larval, foi extraído o RNA da cabeça, cutícula, intestino e os demais tecidos juntos. Na fase adulta, foram utilizados cérebro, cutícula, intestino, aparelho reprodutor masculino (ARM) e aparelho reprodutor feminino (ARF). Após a síntese do cDNA, foi realizada a qRT-PCR e posterior análise utilizando três algoritmos: BestKeeper, geNorm e NormFinder. Para a obtenção de uma lista consenso dos resultados das três análises, foi utilizado o pacote RankAggreg. O ranking dos genes candidatos variou pouco entre o BestKeeper, geNorm e NormFinder e nem todos os genes são estávelmente expressos em todos os tecidos e órgãos de *A. grandis*. É importante notar que para cada tecido, foi obtido um ranking diferente dos genes mais estávelmente expressos. Sendo que entre os mais estáveis, no geral, estão a B-TUB e o GAPDH. Desta forma, o presente trabalho fornece um ranking de genes que podem ser utilizados como controle interno de expressão para futuros estudos de perfil de expressão gênica em diferentes fases e tecidos de *A. grandis*.

Palavras-chave: bicudo-do-algodoeiro, PCR quantitativa, genes constitutivos.

1.1. INTRODUÇÃO

A PCR quantitativa (qRT-PCR) tem se tornado a técnica mais amplamente utilizada em pesquisas para análise de expressão gênica, visto que permite o entendimento a respeito dos complexos processos biológicos (Hong et al., 2008; Bustin et al., 2009). Em comparação à PCR clássica, as principais vantagens da qRT-PCR são a alta sensibilidade, especificidade e possibilidade de quantificação da expressão de uma gama de genes em diferentes condições ao mesmo tempo (Ginzinger, 2002; Bustin e Nolan, 2004; Gachon et al., 2004; Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

Esta ferramenta é amplamente utilizada em estudos de regulação biológica e é frequentemente correlacionada com ensaios de quantificação. Por detectar expressão diferencial de um transcrito em amostras biológicas distintas, assim como tipos de tecidos sob condições experimentais diferentes, a invenção da qRT-PCR tem uma importância significativa no campo de análise da expressão gênica dos organismos vivos (Barber et al., 2005). É frequentemente utilizada para confirmar sistemas de alto desempenho como microarranjos e é uma ferramenta válida para estudos ecológicos, visto que fornece uma maneira relativamente simples de medir a resposta transcricional direta de um organismo exposto a diferentes tratamentos (Snell et al., 2003). A qRT-PCR tem sido também aplicada a estudos de evolução adaptativa a nível transcricional (Muller et al., 2004; Zientz et al., 2006; Ellers et al., 2008). Apesar de ser uma técnica poderosa, a qRT-PCR tem seus vieses e, o mais importante, há a necessidade de uma normalização de dados apropriada com genes referência (Schmittgen e Zakrajsek, 2000; Bustin, 2002; Andersen et al., 2004; Bustin e Nolan, 2004; Bustin et al., 2005; Huggett et al., 2005; von Smolinski et al., 2005). Entretanto, apesar da sua importância, a adequabilidade de genes referência para qualquer tipo de experimento não tem sido prioridade nos estudos frequentemente realizados.

Assim, atualmente é bem estabelecido que genes referência (ou genes constitutivos) para normalização dos dados devem ser validados em cada tipo de condição experimental (Reid et al., 2006; de Almeida et al., 2010; Migocka e Papierniak, 2011). A adoção de uma validação sistemática de genes referência

deve ser uma prática rotineira para permitir melhoras na acurácia das análises da qRT-PCR (Guenin et al., 2009). É também importante notar que o uso de um único gene referência não é mais suficiente e a normalização com múltiplos genes é agora considerada altamente necessária (Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002; Remans et al., 2008). A necessidade por controles internos nestes ensaios surge dos vieses relacionados ao fato de que experimentos anteriores têm demonstrado que os níveis de expressão destes chamados “genes constitutivos” diferem entre tipos de tecidos e órgãos distintos (Foss et al., 1998; Thellin et al., 1999; Aoki et al., 2000; Schmittgen and Zakrajsek, 2000; Suzuki et al., 2000; Lee et al., 2002; Czechowski et al., 2005; Olsvik et al., 2005; Zhang e Hu, 2007). Para corrigir isto, devem ser realizadas validações de genes constitutivos que serão utilizados como referência para cada condição experimental diferente. Idealmente, estes genes devem ter níveis de expressão invariável e serem fortemente correlacionados com a quantidade total do RNAm presente em cada amostra. Os genes de referência mais comumente utilizados são β -actina, ubiquitina, a subunidade ribossomal 18S, ou gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). De fato, muitos fabricantes de kits para qRT-PCR fornecem painéis de genes referência (*housekeeping gene panels*) contendo alguns destes genes. Em muitos laboratórios, estes são utilizados como genes referência de “propósito geral” para uma gama de variedade de condições experimentais. Além disso, algoritmos estatísticos, como o geNorm (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (Andersen et al., 2004) e BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), foram desenvolvidos para determinar os genes referência mais apropriados.

Apesar da técnica de qRT-PCR estar sendo amplamente utilizada para estimar expressão gênica em insetos, há ainda uma carência de estudos para validar a estabilidade de expressão dos genes referência em muitas espécies. Em *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), o fator de iniciação da tradução 4A, o fator de iniciação da tradução 3 subunidade 4 e o fator de iniciação da tradução 3 subunidade 5 foram relatados como os genes de referência mais confiáveis durante a metamorfose (Wang et al., 2008). No entanto, o gene mais comumente utilizado, o da actina, variou drasticamente nestes experimentos.

Os genes das proteínas ribossomais RPS3, RPS18 e RPL13a foram os genes mais estáveis em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) expostos ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Lord et al., 2010). Estes resultados demonstram a importância da realização de estudos de estabilidade dos genes referência para condições experimentais específicas e diferentes organismos, visto que os genes mais adequados para cada estudo tendem a ser diferentes. O aumento no número de sequências de genoma e transcrito de diferentes insetos publicados tem tornado disponível uma grande quantidade de novos genes a serem analisados por qRT-PCR, para investigar sua regulação transcricional. Neste contexto, as sequências do transcrito de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) já estão disponíveis num banco de dados próprio do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Cenargen e sua primeira anotação automática será logo liberada. Este inseto é uma das pragas mais destrutivas do algodão cultivado, *Gossypium hirsutum* L., nas Américas. Assim, faz-se necessária a avaliação da estabilidade dos genes referência comumente utilizados na literatura para este inseto a fim de auxiliar na escolha de genes adequados para a normalização do RNAm em condições que são comumente focos de estudos com *A. grandis*, como os tratos reprodutivos, intestino e larva e adulto e outros.

1.2. OBJETIVO

- Determinar a estabilidade de nove genes referência em diferentes tecidos de larvas e adultos de *A. grandis* por meio de qRT-PCR.

1.3. Material e Métodos

1.3.1. Coleta das amostras – dissecação de larvas de adultos de *A. grandis*

Larvas e adultos de *A. grandis* foram obtidos do Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. Partes de larvas de 3^o instar e adultos machos e fêmeas foram dissecadas e separadas para análise da estabilidade gênica. As

partes das larvas foram separadas e denominadas: cabeça, intestino, cutícula e outros tecidos (correspondendo a todas as estruturas torácico-abdominais do inseto, menos o intestino). As partes dos adultos foram divididas em: cérebro, cutícula dorsal, intestino, aparelho reprodutor masculino e aparelho reprodutor feminino. As dissecções foram feitas conforme mostrado na figura 1 para larvas e figura 2 para adultos.

Na dissecção, foram utilizados alfinetes entomológicos e tesoura oftalmológica cirúrgica. Para larvas, os alfinetes foram utilizados para manter a larva com a parte dorsal para baixo, evitando ao máximo o dano de estruturas (Figura 1 a, b). Uma incisão longitudinal foi feita com a tesoura na região ventral (Figura 1c). Após identificar o intestino, foi feito um corte próximo à cabeça (no intestino anterior) e outro na porção terminal do intestino, separando-o. O intestino foi colocado em água-DEPC e lavado para retirar resíduos de dieta (Figura 1d). Todo o conteúdo interno da larva foi então retirado, e a este conteúdo deu-se o nome de “outros tecidos” (Figura 1e, f). Após esse procedimento, a cutícula e a cabeça restantes, foram separadas (Figura 1g, h, i).

Para dissecção dos adultos, machos e fêmeas foram separados após sexagem, descrita por Sappington e Spurgeon (2000). Em primeiro lugar, os élitros, foram retirados (Figura 2a, b). Em uma placa de Petri contendo massa de modelar, o inseto adulto foi fixado já sem os élitros, com a região dorsal para cima (Figura 2c, d). Utilizando a tesoura cirúrgica, a cutícula dorsal foi retirada, deixando o abdômen exposto (Figura 2e, f, g). Todo o conteúdo abdominal foi retirado e intestino (Figura 2h), aparelho reprodutor feminino (Figura 2i) e aparelho reprodutor masculino (Figura 2j) foram separados. Além disso, a cabeça do inseto foi cortada e aberta, para retirar o cérebro (Figura 2k). Durante a dissecção, procurou-se preservar toda a estrutura cerebral: lobos ópticos, *corpora allata*, protocérebro, deutocérebro e tritocérebro, e os gânglios circum-esofágico, subesofágico e frontal. Na dissecção de larvas e adultos, todas as estruturas foram imediatamente colocadas em N₂ líquido e armazenadas em freezer a -80 °C até o uso.



Figura 1. Dissecção da larva de *Anthonomus grandis*. Após fixação da larva em massa de modelar (a, b), a cutícula foi aberta na região ventral (c). Após a remoção do intestino (d), foi retirado o conteúdo abdominal, chamado de Resto (e, f). A cutícula, então, foi separada da cabeça (g, h, i). Maiores detalhes no texto.

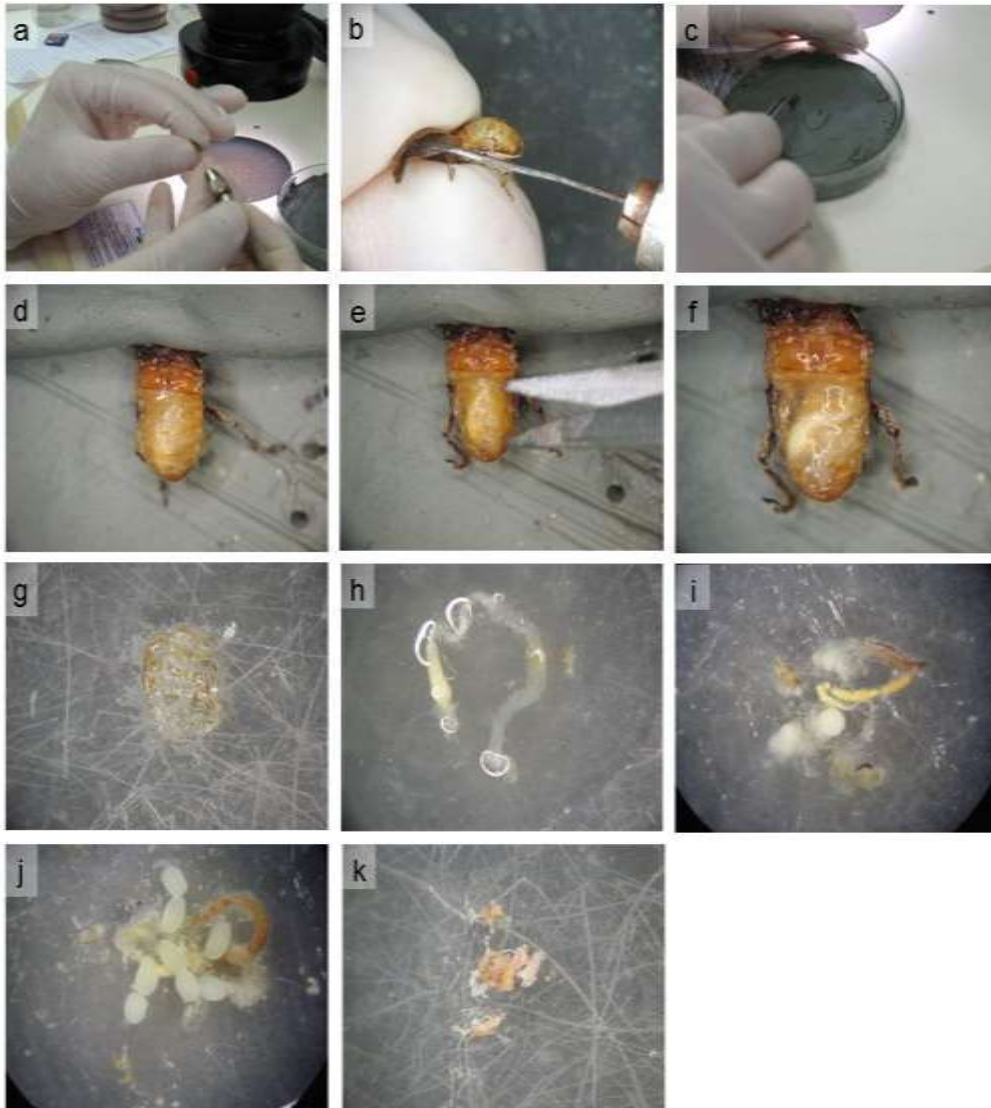


Figura 2. Dissecção do adulto de *Anthonomus grandis*. Após a retirada dos élitros (a, b), o bicudo foi fixado em massa de modelar (c, d) e a cutícula dorsal retirada (e, f, g). Foram retirados intestino (h), aparelho reprodutor masculino (i), aparelho reprodutor feminino (j) e cérebro (k).

1.3.2. Seleção das sequências gênicas e desenhos dos *primers*

Foram selecionados nove genes para a análise da estabilidade de expressão: arginina quinase (ArgK), β -actin (B-ACT), β -tubulin (B-TUB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongação alfa 1 (EF1A), ubiquitina (UBQ) e proteínas ribossomais S3, S11 S26 (RPS3, RPS11 e RPS26, respectivamente). Oligonucleotídeos iniciadores (chamados de *primers*) para cada gene foram desenhados utilizando a ferramenta Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen and Skaletsky, 2000) a partir das sequências de nucleotídeos presentes no banco de dados do transcrito de *A. grandis* para gerar um *amplicon* que varia entre 150 e 200 pares de bases (pb), com o objetivo de evitar tamanhos muito diferentes a serem amplificados. Para todos os *primers*, a temperatura de desnaturação de metade das moléculas (T_m) foi de 60 °C (Tabela 1). Na tabela 2 está apresentada a função de todos os genes selecionados.

Tabela 1. *Primers* utilizados nos experimentos de qRT-PCR

Nome do gene	Símbolo do gene	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	T_m (°C)
b-Actina	B-ACT	CCTTAAACACCCTGCTATG	TGAGGTAGTCGGTCAAGTC A	192	60
b-Tubulina	B-TUB	GGTTGCGACTGTTTACAAGG	GCACCACCGAGTAAGTGTT C	156	60
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GAPDH	AGATCGTCGAGGGTCTGATG	AAGGCGGAATGACTTTAC C	166	60
Proteína ribossomal subunidade 3	RPS3	TTGGAGACGGAGTCTTCAAG	TCCCAATACACGGTCAGTT C	146	60
Proteína ribossomal subunidade 11	RPS11	ACCCACGGTTTTCTTAACC	GACGACTCCGGTGAGGATA C	178	60
Proteína ribossomal subunidade 26	RPS26	TCCCAAAGACAAGGCAAT C	CCTTCTGCTCCTGTTACGC	183	60
Arginina quinase	ArgK	ACAAGGGTGGTCAAGTCGA G	CTACCGCTACAGCCTGATC C	161	60
Fator de alongação 1 - a	EF1A	CCGTTTTATTGCCGTAGA	AACATCTCCACTCCCGTGA C	158	60
Proteína de conjugação de ubiquitina	UBQ	CGCTTCGCGCTACTGTACT	ACTCTTCAAGCGCAAACGA T	175	60

Tabela 2. Função dos genes selecionados para os experimentos de validação de genes referência de *Anthonomus grandis*.

Símbolo do gene	Função
B-ACT	proteína estrutural do citoesqueleto
B-TUB	proteína estrutural do citoesqueleto
GAPDH	envolvida em reações de glicólise
RPS3	proteína ribossomal
RPS11	proteína ribossomal
RPS26	proteína ribossomal
ArgK	fosfotransferase
EF1A	entrega enzimática de aminoacil-tRNAs para os ribossomos
UBQ	proteólise

1.3.3. Isolamento do RNA total e síntese de cDNA de tecidos de larvas de adultos de *A. grandis*

O RNA total foi isolado com o reagente Trizol® (Invitrogen Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. DNA genômico foi removido via tratamento com 2 U de DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences). O RNA extraído foi purificado utilizando a coluna do RNeasy Micro Kit (Qiagen) e a integridade do RNA confirmada em eletroforese em gel de agarose 1,5% e quantificado no fluorômetro Qubit utilizando ensaio com Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies). Para síntese de cDNA, foi utilizado 500 ng de RNA total. A ausência de amplicons após PCR usando Taq-polymerase (MRC Holland, The Netherlands) e 1 µL da solução de RNA, foi realizada para confirmar a ausência de contaminação por DNA nas amostras utilizadas nas etapas seguintes.

Síntese de cDNA foi realizada utilizando o sistema de transcritase reversa do kit “Superscript III™ First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Primeiramente, foi realizada uma PCR para obter os fragmentos gênicos, que foram em seguida clonados e sequenciados com o objetivo de

testar os *primers* e confirmar a amplificação dos genes selecionados. A PCR foi feita com um passo de 95 °C por um minuto, seguido por 30 ciclos de incubações a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. Após a reação, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 1% e o fragmento amplificado correspondente foi excisado do gel e o DNA purificado. O DNA foi extraído com QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após quantificação, os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T easy de acordo com o protocolo descrito pelo kit “pGEM ®-T Easy Vector System I” (Promega) e o vetor foi purificado e sequenciado.

1.3.4. Ensaios de qRT-PCR

Para realização da qRT-PCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 1). Cada reação foi feita num volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de SYBR Green Rox Plus PCR Mix (LGC Biotecnologia), 2 µL de cDNA diluído 40 vezes, 4,7 µL de H₂O bidestilada e 0,4 µL de cada *primer* (0,2 µM direto e reverso). A reação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de incubações a 95 °C por 15s e a 60 °C por 1 min. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada fragmento amplificado (60 - 94°C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de *primer* ou contaminação da amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água em vez de cDNA foram incluídos para verificar presença de contaminantes nas amostras. Um controle negativo contendo RNA total foi feito para garantir a ausência de DNA genômico. Os níveis de expressão foram determinados como o número de ciclos necessários para alcançar um limite fixo na fase exponencial da PCR. O número de ciclos foi referido como valor de C_q (quantification cycle), em substituição aos nomes para os antigos C_t (threshold cycle) ou C_p (crossing point), de acordo com as normas RDML (Lefever et al., 2009). A eficiência de cada *primer* para cada reação e as C_{qs} foram calculados individualmente a partir do algoritmo qPCR miner (www.miner.ewindup.info) (Zhao and Fernald, 2005). A análise da estabilidade do nível de transcrição de cada gene em cada tecido ou região do

inseto foi feita utilizando as ferramentas geNorm plus (Biogazelle Company) (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) (Andersen et al., 2004) e Bestkeeper (<http://bioinformatics.gene-quantification.info/bestkeeper.html>) (Pfaffl et al., 2004).

Também foi realizada uma análise de estabilidade combinada das medidas produzidas pelo geNorm, NormFinder e Bestkeeper para estabelecer um ranking consenso dos genes, aplicando o pacote RankAggreg (<http://cran.r-project.org/web/packages/RankAggreg/index.html>) (Pihur and Datta, 2009; Mallona et al., 2010).

1.4. Resultados

1.4.1. Seleção dos candidatos à genes referência

De acordo com as publicações sobre qRT-PCR, nove genes comumente utilizados para normalização de RNAm em quantificações foram escolhidos como candidatos. Os genes referência selecionados para a validação da estabilidade de expressão incluem: arginina quinase (ArgK), β -actina, β -tubulina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongação-1 alpha (EF1A), ubiquitina (UBQ) proteínas ribossômicas S3, S11 e S26 (RPS3, RPS11 e RPS26, respectivamente). As sequências destes genes em *A. grandis* foram obtidas a partir de banco de dados de transcrito da Embrapa Cenargen. Neste trabalho, foi utilizado, quando matematicamente possível, as recomendações do MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) para gerar resultados mais confiáveis de qRT-PCR com interpretação indiscutível (Bustin et al., 2010). Um cDNA de um dos genes foi sempre usado como normalizador entre as placas. A especificidade dos *primers* foi sempre confirmada por análises das curvas de dissociação e todos os pares de *primers* amplificaram um único produto de PCR com o tamanho esperado.

O sequenciamento dos *amplicons* clonados em vetor pGEM-T easy mostrou que cada fragmento amplificado correspondia ao gene esperado. Houve uma diferença de duas bases para o gene ArgK e uma base para o gene RPS 26, comparando com o *contig* do transcrito (Figura 3). Estas substituições podem ser SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), já que não houve alteração de códons para provocar erros de amplificação pela Taq DNA polimerase, ou por erros de sequenciamento. Todas as outras sequências tiveram 100% de identidade com o respectivo *contig*. E a identificação de todas as sequências, sem exceção, foi confirmada por BLASTn.

> ArgK
 ACAAGGGTGGTCAAGTCGAGTCGAAACAGTTGTCATAGACAGGCATTTCATTGGTCGGGGACACGGCCGAGATGGCTCATTGATTTAACAAAACCTGC
 GCCCTGTTTGC(A)AAGTGGGATTC(A)GTTAAACGAAAGTCGGGATCAGGCTGTAGCGGTAG

(T) (G)

> β-Aetina
 CCTTAAACACCCCTGCTATGTACGTAGCAATCCAAGCCGTAICTCTCTTGTACGCTTCCGGTCGTACCACCGGTATCGTCTTGGACTTGGCGATGGTGTAA
 CCCACACCGTCCCAATTAIGAAGGTATGCTCTTCCCACGCCATCTTCGTTTGGACTTGGCCGGTCGTGACTTGACCGACTACCTCATGAAG

> β-Tubulina
 GTGCGTAAGGAGGCCGAGGGTTGCGACTGTTTACAAGGGTTCCAATTGACCCACTCTTGGGGGGCGGTIACCGGGTCCGGCATGGGCACCTTACTAAICT
 CGAAGATCCGCAGGAGTACCCGGACAGGATAATGAACACTTACTCGGTGGTGC

> GAPDH
 CCCGTTGGCGAAAGTGATCCACGACAATTCGAGATCGTCGAGGGTCTGATGACGACCGTGCACGCCACCACCGCCACCCAAAAACGGTTCGACGGCCCG
 TCCGGCAAATGTGGAGGGACGGACGCGGGGCCAGCAGAACATCATCCGGCGTCGACCGGTGCCGAAAGCGGTGCGTAAAGTCAATCCCGCCTT

> EF1A
 CCGTTTTTATGCCCCTGAGAACACACTTACTCCATCCCTGGTAGAGGCACAGTGGTCACGGGAAGACTGGAGAGAGGAGTCTTAAAAAGGGGGCGGACT
 TGAATTTGTCGGATTAAATAAGGTGATAAAGAGTACGGTCACGGGAGTGGAGATGTT

> RPS3
 CACAATCAAAAAAGCGAAAATTCGTTGGAGACGGAGTCTTCAAGGCTGAATTAACGAATCTTAACCAGAGAAGTCTCAGAAGATGGTTACTCAGGTG
 TGGAAAGTACGTGTCAACCCGACTCGTACCGAAATCAATCATGGCCACCAGAACTGACCGTGTATTGGGA

> RPS11
 ACCCAGGTTTTCCTTAACCCCAAACAAGCCAGCAAAAAGAAGGTTGTAAGGTTATCAAGGAATGTAGGGCTCGGGTCAAACCCCTAGAGAGGCCATCG
 AAGTCACTACATCGACAAAAATGCCATTACCGGCAACGTGTGATCCGAGGCCGATCTCACCGGAGTCGTC

> RPS26
 TCCCAAAGACAAGGCAATCAAGAAATTCGTCATTAGAAAATTTGTGAAAGTGCCTGAGT(A)GGGATATCACTGAGGCTTCAGTATATAATCAATACCTCC
 TTCCAAAGTTGTACCGAAGCTTCACTACTGTGTCTCTTGGCTATCCACAGCAAAGTGTGCGTAAACAGGAGCAAGAAGG

(G)

> UBQ
 CGCTTCGCGCTACTTGTACTTGGCATTACCGTTTAAACGTAACCACTGCTGGACTCGAACTTGGACTCGTAAAATTTCTAGTGGATCAGTATTCCTACTGTT
 CAACTGTAAGGATCAGTTCGCGGGATCAGTTCAGTATTAGGCAATATTGAATCGTTTGGCTTGAAGAT

Figura 3. Sequências dos produtos de PCR gerados com os *primers* dos genes candidatos de referência. Em destaque, os nucleotídeos sequencias de ArgK e RPS26 de *Anthonomus grandis* foram diferentes do *contig* retirado do transcrito (entre parênteses em vermelho).

1.4.2. Níveis de expressão dos genes candidatos a referência

Os valores de Cq na qRT-PCR deu uma visão geral da variação da expressão gênica nas amostras. Todos os genes referência selecionados tiveram abundância moderada em diferentes estágios e tecidos de *A. grandis*. Genes referência individuais tiveram diferentes níveis de expressão nas diferentes amostras testadas. De acordo com as variações dos valores de Cq, UBQ mostrou a menor variação da expressão gênica, (abaixo de cinco ciclos), enquanto que RPS11 teve a maior variação de expressão (acima de 20 ciclos). A variação dos valores de Cq em todos os nove genes referência testados indica que não houve gene referência com expressão constante sob as condições utilizadas. Assim, a determinação de um gene como referência requer uma confirmação cuidadosa da estabilidade de expressão.

1.4.3. Análise de estabilidade de expressão utilizando Bestkeeper

As análises de estabilidade dos genes foram feitas com as três ferramentas mais utilizadas atualmente para estudo de genes de referência, Bestkeeper, geNorm e NormFinder. O mais importante na identificação de genes de referência expressos de forma estável é que os genes precisam ter um perfil de expressão similar entre as amostras, isto é, seus níveis de expressão devem ter uma alta correlação.

O Bestkeeper usa dados brutos (valores de Cq) e eficiência dos *primers* na PCR para determinar os genes mais estáveis e os combina em um índice. A partir disso, a correlação de cada gene candidato com este índice é calculada e expressa pelo coeficiente de determinação e pelo valor de p (probabilidade). O Bestkeeper ainda determina o desvio-padrão e o “poder” de referência de cada gene, cabendo ao usuário selecionar os melhores genes baseado nessas variáveis (Pfaffl et al., 2004).

Baseado na análise de variações calculadas (SD), o Bestkeeper revelou uma estabilidade de expressão para cada um dos nove genes ($SD < 1$) diferente em cada parte do inseto adulto ou larva (Tabela 3). Além disso, os

melhores genes candidatos se relacionaram de maneira significativa com o índice do Bestkeeper calculado como a média geométrica dos valores de Cq dos diferentes genes para um determinado cDNA ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação (CD) de cada gene indica a maior estabilidade para cada gene quanto mais perto de 1 for o valor de CD. A variância intrínseca (InVar) desses genes para uma determinada amostra teve baixa variação dos valores de Cq. O Bestkeeper analisa a integridade da amostra através do cálculo de uma variação intrínseca para uma amostra, entre as diferenças nos valores respectivos de Cq e o valor médio de Cq para cada gene referência (Pfaffl et al., 2004).

No caso dos adultos, as proteínas ribossomais e a ubiquitina não se apresentaram como bons candidatos a genes referência. Em primeiro lugar, a amplificação para estes genes ocorreu sempre após 35 ciclos. Mas o mais importante é que para a maioria dos casos, a variação intrínseca (InVar) dentro das amostras para estes genes variou muito, e esses dados foram descartados, conforme recomendado Pfaffl et al. (Pfaffl et al., 2004). Para o cérebro, os genes mais estáveis, baseado no coeficiente de determinação são ArgK e EF1A. No entanto, o coeficiente para estes genes foi baixo (Tabela 3). Para a cutícula dorsal, os resultados foram melhores, sendo os genes GAPDH, ArgK, EF1A e β -tubulina e β -actina considerados todos bons candidatos. No caso do intestino de adulto, β -actina e EF1A foram os mais estáveis. Os genes β -actina e GAPDH foram os mais estáveis para o aparelho reprodutor feminino (ARF). Interessante notar que pelo coeficiente de determinação, o gene RPS3 teve a melhor avaliação. No entanto, devido a sua amplificação tardia, não é aconselhável utilizá-lo como referência. Para o aparelho reprodutor masculino (ARM), apenas ArgK possuiu uma avaliação razoável.

A análise dos tecidos das larvas revelou um perfil melhor para os genes candidatos (Tabela 3). Apenas para o gene da ubiquitina (UBQ) os valores de InVar foram muito altos e por isso os dados foram descartados. Para a cabeça da larva os genes candidatos RPS26, GAPDH, β -tubulina, ArgK e EF1A tiveram bons resultados. A cutícula da larva teve como genes mais estáveis, GAPDH, ArgK, EF1A e β -tubulina e β -actina. Os outros genes tiveram Cqs

entre 36 e 38, e não foram analisados. Para o intestino, RPS26 e β -tubulina tiveram CDs mais altos. A análise dos demais tecidos mostrou que GAPDH e os genes de proteínas ribossomais foram os mais estáveis.

Tabela 3. Análise estatística descritiva dos nove genes referência candidatos de *Anthonomus grandis* baseado no valor de Cq, como calculado pelo algoritmo BestKeeper.

	ArgK	B-ACT	B-TUB	GAPDH	EF1A	UBQ	RPS3	RPS11	RPS26
Adulto - cérebro									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	26.37	25.61	26.45	26.72	26.66	-	-	-	-
Desvio padrão (\pm Cq)	0.16	0.32	0.38	0.26	0.89	-	-	-	-
Coefficiente de determinação	0.58	0.13	0.15	0.02	0.48	-	-	-	-
P	0.047	0.043	0.038	0.048	0.085	-	-	-	-
Adulto - cuticula									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	24.46	23.74	24.67	24.93	24.00	-	-	-	-
Desvio padrão (\pm Cq)	0.36	0.33	0.43	0.46	0.39	-	-	-	-
Coefficiente de determinação	0.95	0.86	0.90	0.97	0.92	-	-	-	-
P	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	-	-	-	-
Adulto - intestino									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	23.08	21.96	23.43	23.45	22.54	-	-	-	-
Desvio padrão (\pm Cq)	0.13	0.56	0.14	0.36	0.08	-	-	-	-
Coefficiente de determinação	0.00	0.69	0.19	0.03	0.64	-	-	-	-
P	0.977	0.005	0.235	0.653	0.09	-	-	-	-
ARF									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	23.23	22.90	24.06	23.99	23.12	-	35.43	-	-
Desvio padrão (\pm Cq)	0.13	0.27	0.18	0.31	0.13	-	0.83	-	-
Coefficiente de determinação	0.65	0.95	0.73	0.83	0.60	-	0.97	-	-
P	0.054	0.001	0.030	0.011	0.071	-	0.001	-	-
ARM									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	24.58	23.04	23.90	24.22	24.17	-	-	-	-
Desvio padrão (\pm Cq)	0.25	0.23	0.19	0.38	0.51	-	-	-	-
Coefficiente de determinação	0.78	0.52	0.00	0.56	0.00	-	-	-	-
P	0.004	0.043	0.954	0.032	0.893	-	-	-	-
Larva - cabeça									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	24.35	16.91	18.14	17.77	21.15	-	20.63	18.46	15.99
Desvio padrão (\pm Cq)	0.33	0.16	0.35	0.46	0.36	-	0.52	0.34	0.58
Coefficiente de determinação	0.88	0.58	0.97	0.98	0.86	-	0.87	0.65	0.99
P	0.001	0.017	0.001	0.001	0.001	-	0.001	0.009	0.001
Larva - cuticula									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	25.01	24.20	25.25	25.49	24.59	-	-	-	-
Desvio padrão (\pm Cq)	0.25	0.44	0.37	0.49	0.31	-	-	-	-
Coefficiente de determinação	0.91	0.92	0.89	0.98	0.95	-	-	-	-
P	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	-	-	-	-
Larva - intestino									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	19.11	18.39	15.89	16.77	20.09	-	17.81	15.48	14.29
Desvio padrão (\pm Cq)	0.29	0.15	0.30	0.23	0.14	-	0.45	0.19	0.24
Coefficiente de determinação	0.01	0.03	0.82	0.11	0.65	-	0.79	0.66	0.83
P	0.789	0.682	0.002	0.018	0.015	-	0.003	0.015	0.002
Larva - outros tecidos									
N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Média geométrica (Cq)	23.06	21.12	20.12	18.81	21.96	-	21.25	19.11	17.20
Desvio padrão (\pm Cq)	0.17	0.16	0.28	0.34	0.12	-	0.43	0.23	0.24
Coefficiente de determinação	0.63	0.49	0.73	0.93	0.76	-	0.84	0.86	0.81
P	0.010	0.035	0.003	0.001	0.002	-	0.001	0.001	0.001

Nota: N, número de repetições; Cq, ciclo de quantificação; P, probabilidade.

1.4.4. Análise de estabilidade de expressão utilizando geNorm

GeNorm é uma aplicação visual básica para Microsoft Excel e determina a estabilidade da expressão dos genes referência candidatos acessando a medida de estabilidade gene a gene, chamada M. Esta medida é baseada no princípio de que a razão de expressão de dois genes referência “ideais” deveria ser idênticos em todas as amostras independentemente do experimento ou tipo celular. Os genes referência são ranqueados de acordo com o valor médio de M, o número ótimo de genes referência é determinado e o fator de normalização pode ser derivado baseado na média geométrica do nível de expressão (quantidades relativas) dos genes referência mais estáveis (Vandesompele et al., 2002). O valor de estabilidade M é inversamente proporcional à estabilidade. Os genes são, então, classificados de acordo com a estabilidade por um processo de exclusão passo a passo dos genes menos estáveis, gerando o valor de V. Quanto menor este valor, maior a estabilidade e a possibilidade do gene excluído influenciar na expressão relativa de genes-alvo.

Os valores de M obtidos por geNorm estão plotados na figura 4. Os valores de M para todas as partes do inseto adulto e larva que estão abaixo de 1,5 indicam que a expressão de diferentes candidatos é relativamente estável. Em alguns casos apenas, como aparelho reprodutor feminino, cérebro e cutícula de adulto, os genes tiveram valor de M acima de 1,5. Entretanto, genes estáveis foram diferentes entre as diversas partes do inseto. Entre os mais estáveis para a maioria das partes estão β -tubulina, β -actina, GAPDH, ArgK e EF1A.

Análise de variação dos pares de genes para estimar o efeito de incluir um gene adicional nos experimentos de qPCR para expressão relativa (Vandesompele et al., 2002) mostrou que entre as diferentes partes do inseto o uso de dois genes referência pode ser suficiente para normalizar os valores de expressão dos genes-alvo, tanto para adultos quanto para larvas (Figura 5). A adição de um terceiro gene contribuiu muito pouco para uma diminuição do fator de normalização, a não ser no caso do cérebro. A inclusão dos genes

menos estáveis pode levar a um aumento ou diminuição do fator de normalização. Uma alta variação V indica que o gene adicionado tem um efeito significativo e não deve ser incluído na normalização. Na figura 5, o limite para V é 0,15 (Vandesompele et al., 2002).

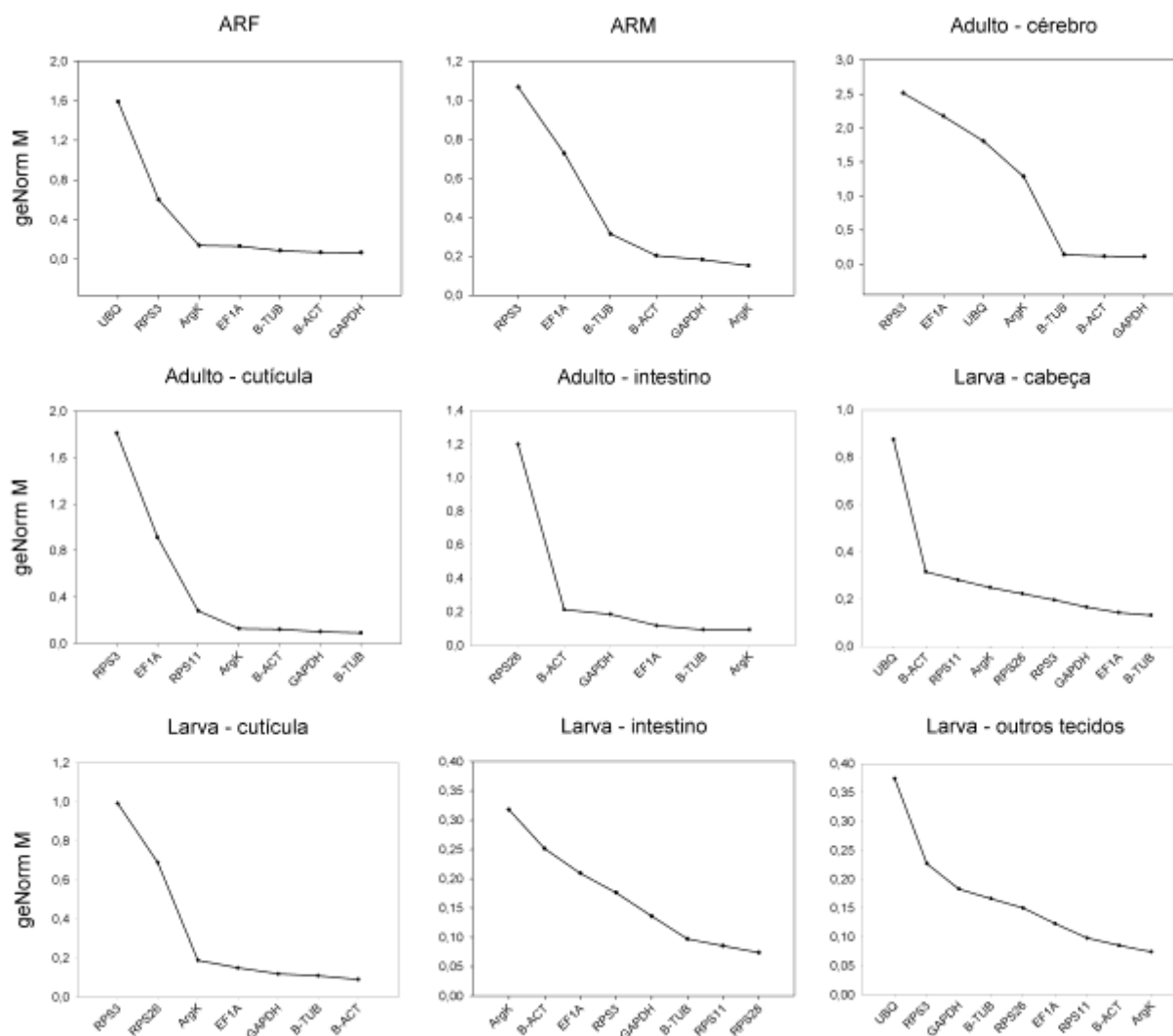


Figura 4. Valores de estabilidade de expressão média (M) dos nove genes referência candidatos de *Anthonomus grandis* utilizando geNorm. Um valor de M baixo indica maior estabilidade de expressão, em diferentes tecidos/órgãos, sendo estes: aparelho reprodutor feminino (ARF); aparelho reprodutor masculino (ARM); cérebro; cutícula e intestino do inseto adulto e; cabeça; cutícula; intestino e outros tecidos da larva.

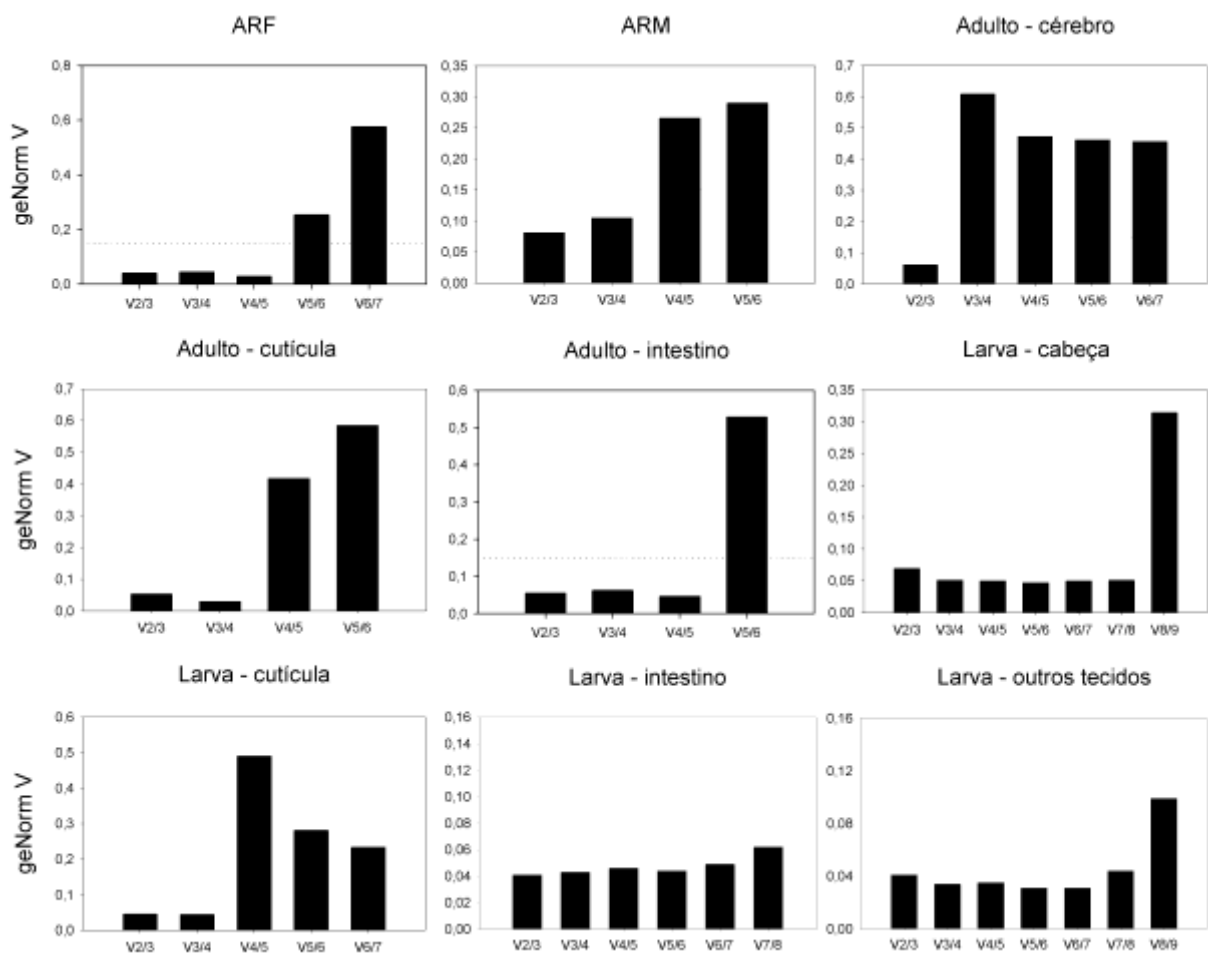


Figura 5. Análise de variação “pairwise” dos fatores de normalização para determinar o número ótimo de genes referência para a normalização calculado pelo geNorm. As variações pairwise médias são calculadas entre os fatores de normalização NF_n e NF_{n+1} para indicar se a inclusão de um gene referência extra adiciona estabilidade ao fator de normalização. A análise foi realizada com base nos diferentes tecidos/órgãos, sendo estes: aparelho reprodutor feminino (ARF); aparelho reprodutor masculino (ARM); cérebro; cutícula e intestino do inseto adulto e; cabeça; cutícula; intestino e outros tecidos da larva.

1.4.5. Análise de estabilidade de expressão utilizando NormFinder

Normfinder é outra aplicação visual básica, que também atribui o valor de estabilidade de cada gene referência candidato. Este valor ranqueia o gene utilizando uma abordagem baseada em modelo (modelagem de efeito linear misto). Ao invés de analisar a expressão de todo o conjunto de dados, como o geNorm, este programa foca nas variações de expressão inter e intragrupos. Este processo permite uma medição direta da variação da expressão, permitindo ao usuário avaliar o erro sistêmico introduzido quando utilizar como modelo um determinado gene. Da mesma forma que o geNorm, o NormFinder gera um valor de estabilidade M para cada gene, que é a medida direta da variação da expressão estimada. Esta variação na expressão está diretamente relacionada com o valor M, já que um baixo valor M demonstra menor variação de expressão gênica entre as amostras estudadas (Andersen et al., 2004).

A análise por NormFinder mostrou um perfil parecido com a análise por geNorm. β -tubulina, β -actina, GAPDH, ArgK e EF1A foram mais estáveis para todas as partes do inseto adulto (Figura 6). Na larva, alguns genes de proteínas ribossomais estão entre os mais estáveis (Figura 6).

O NormFinder foi a única ferramenta que permitiu a análise de todos os genes e todas as partes dos insetos adulto (intragrupo 1) e larva (intragrupo 2) e intergrupos (Figura 7), sendo GAPDH e β -tubulina os dois genes mais estáveis para todas as partes. É interessante notar que as combinações de dois candidatos calculada no NormFinder, reduziu o valor da estabilidade no conjunto de partes de adulto e de larva, mas não correspondem sistematicamente aos genes mais estáveis individualmente para a análise intergrupos (larvas e adultos) (Tabela 4).

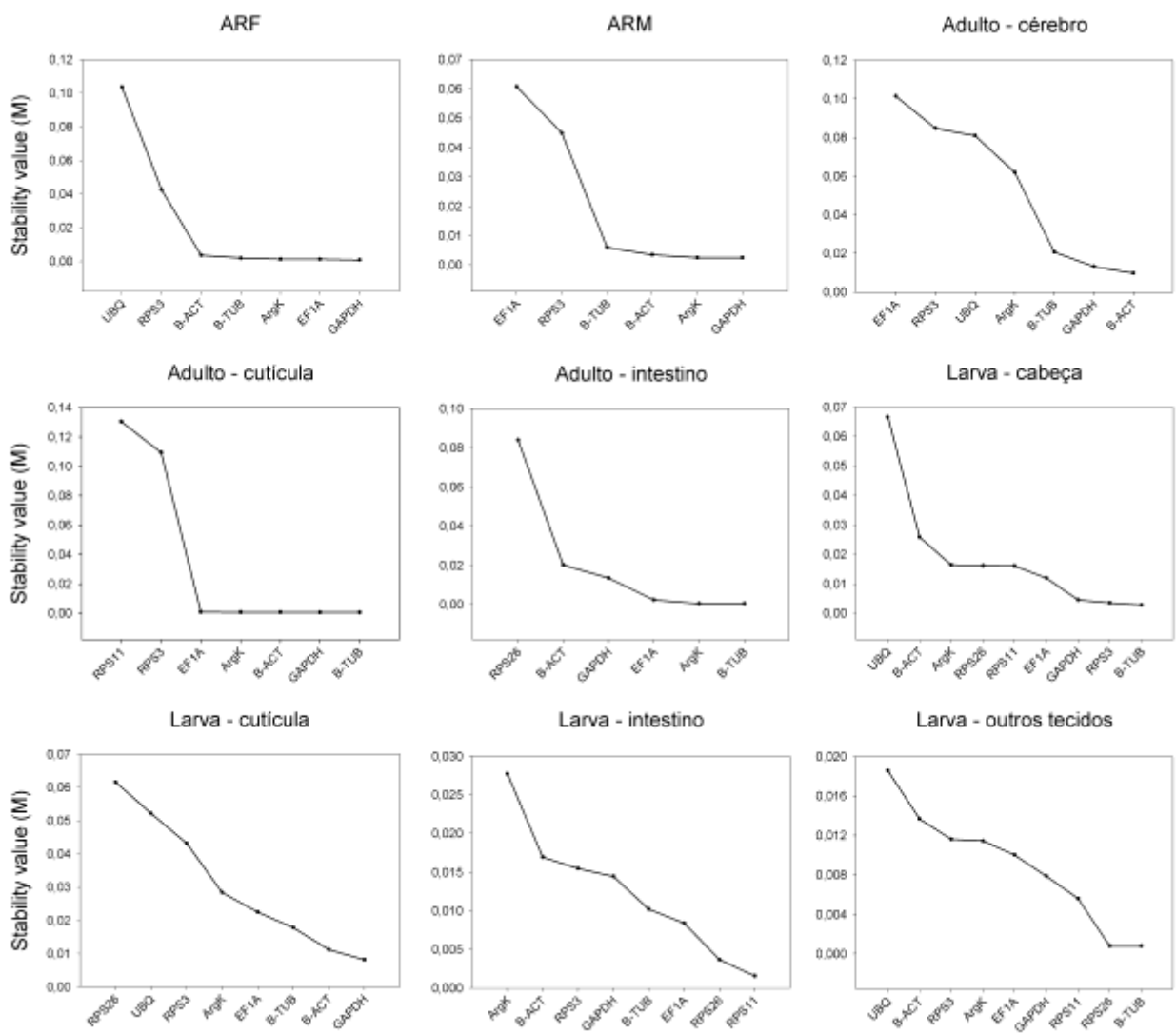


Figura 6. Valores de estabilidade de expressão dos genes referência candidatos analisados pelo NormFinder. Os valores médios de estabilidade de expressão dos genes referência estão demonstrados em todos os tecidos/órgãos avaliados: aparelho reprodutor feminino (ARF); aparelho reprodutor masculino (ARM); cérebro; cutícula e intestino do inseto adulto e; cabeça; cutícula; intestino e outros tecidos da larva.

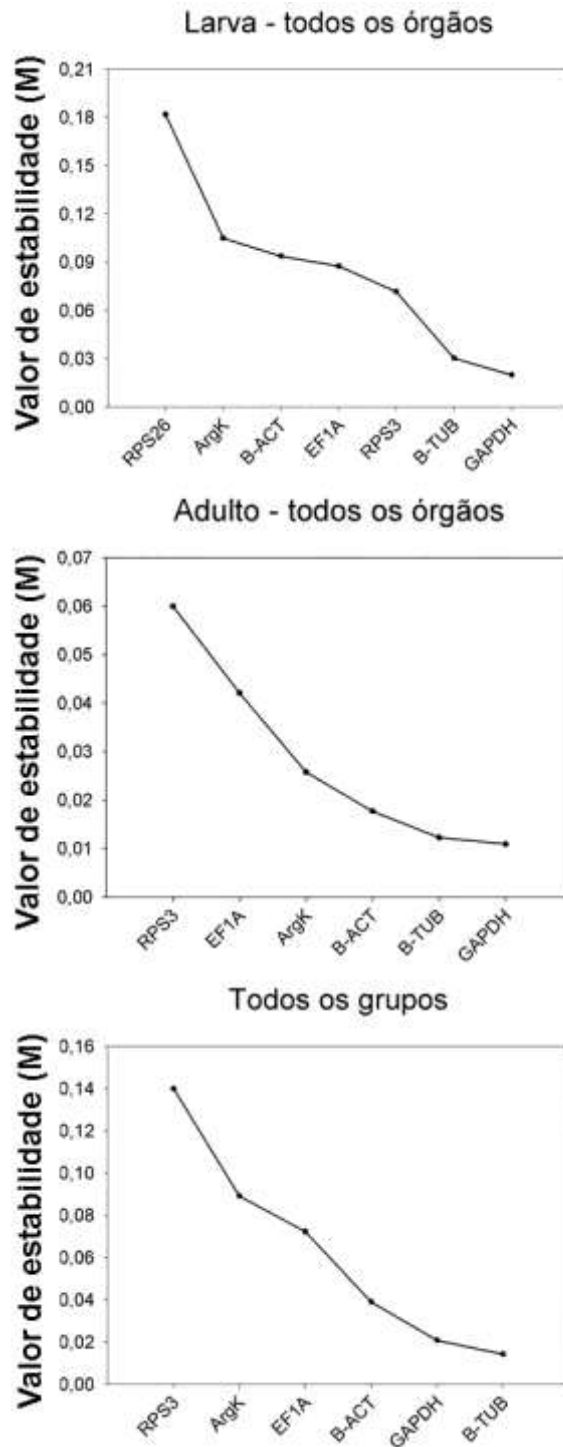


Figura 7. Valores de estabilidade de expressão dos gene referência candidatos analisados pelo NormFinder por grupo. Os valores médios de estabilidade de expressão dos genes referência estão demonstrados em todos os órgãos de larvas; todos os órgãos de adultos e; todos os grupos juntos.

Tabela 4. Análise da combinação de dois genes candidatos com menor valor de M, calculado pelo NormFinder.

Grupo	Components	Genes	valor M (NormFinder)
Intragrupo I	Adulto - todos os órgãos	GAPDH and B-TUB	0.011
Intragrupo II	Larva - todos os órgãos	GAPDH and B-TUB	0.013
Interggrupo	Todos os grupos	GAPDH and B-ACT	0.012

1.4.6. Análise de estabilidade combinada das medidas produzidas pelo geNorm, NormFinder e Bestkeeper

Para análise combinada das medidas produzidas pelo geNorm, NormFinder e Bestkeeper, foi utilizado o pacote do R “RankAggreg”, que tem a habilidade de combinar listas oriundas de diferentes fontes, o que não poderia ser diretamente comparável de outra maneira. A entrada para este pacote estatístico foi a matriz dos genes ordenada num ranking de acordo com as diferentes medidas de estabilidade previamente computadas. Foi calculada a “distância” entre as listas ordenadas usando a função Spearman footrule e o ranking de agregação via o algoritmo Cross-Entropy Monte Carlo. O parâmetro “seed” foi definido a 100 e o argumento “convIn” a 50.

Uma comparação dos rankings produzidos pelos diferentes programas utilizados neste estudo não revelaram diferenças significativas no ranking dos melhores genes referência, apesar das diferenças entre os algoritmos utilizados. Em geral, os diferentes métodos alocaram o mesmo *set* dos três melhores genes referência, mesmo que em diferente ordem, exceto o BestKeeper para o aparelho reprodutor feminino (ARF), cutícula do inseto adulto e outros tecidos da larva (Tabela 5). Entretanto, no estudo realizado, o BestKeeper, foi o algoritmo que apresentou o pior desempenho devido à exclusão de vários genes candidatos pelo alto valor dos desvios-padrão obtidos nas análises (Tabela 3). Isto resultou na impossibilidade de utilizar alguns resultados obtidos pelo BestKeeper para fazer as análises com o pacote RankAggreg (traços presentes na Tabela5).

Tabela 5. *Ranking* dos nove genes referência candidatos de *Anthonomus grandis* de acordo com os valores de estabilidade utilizando as análises dos algoritmos BestKeeper, geNorm e NormFinder. Os candidatos estão listados de cima para baixo em ordem de decréscimo da estabilidade de expressão de acordo com o pacote RankAggreg.

ARF				ARM				Adulto - cérebro			
BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso	BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso	BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso
RPS3	GAPDH	GAPDH	GAPDH	ArgK	ArgK	GAPDH	GAPDH	-	GAPDH	B-ACT	B-ACT
B-ACT	B-ACT	EF1A	B-TUB	GAPDH	GAPDH	ArgK	ArgK	-	B-ACT	GAPDH	GAPDH
GAPDH	B-TUB	ArgK	EF1A	B-ACT	B-ACT	B-ACT	B-ACT	-	B-TUB	B-TUB	B-TUB
B-TUB	EF1A	B-TUB	ArgK	-	B-TUB	B-TUB	B-TUB	-	ArgK	ArgK	ArgK
ArgK	ArgK	B-ACT	B-ACT	-	EF1A	RPS3	RPS3	-	UBQ	UBQ	UBQ
-	RPS3	RPS3	RPS3	-	RPS3	EF1A	EF1A	-	EF1A	RPS3	RPS3
-	UBQ	UBQ	UBQ	-	-	-	-	-	RPS3	EF1A	EF1A

Adulto - cutícula				Adulto - intestino				Larva - cabeça			
BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso	BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso	BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso
GAPDH	B-TUB	B-TUB	B-TUB	B-ACT	ArgK	B-TUB	ArgK	RPS26	B-TUB	B-TUB	B-TUB
ArgK	GAPDH	GAPDH	GAPDH	-	B-TUB	ArgK	B-TUB	GAPDH	EF1A	RPS3	GAPDH
EF1A	B-ACT	B-ACT	B-ACT	-	EF1A	EF1A	EF1A	B-TUB	GAPDH	GAPDH	RPS26
B-TUB	ArgK	ArgK	ArgK	-	GAPDH	GAPDH	GAPDH	ArgK	RPS3	EF1A	RPS26
B-ACT	RPS11	EF1A	RPS11	-	B-ACT	B-ACT	B-ACT	RPS3	RPS26	RPS11	EF1A
-	EF1A	RPS3	EF1A	-	RPS26	RPS26	RPS26	EF1A	ArgK	RPS26	ArgK
-	RPS3	RPS11	RPS3	-	-	-	-	RPS11	RPS11	ArgK	RPS11
-	-	-	-	-	-	-	-	B-ACT	B-ACT	B-ACT	B-ACT
-	-	-	-	-	-	-	-	UBQ	UBQ	UBQ	UBQ

Larva - cutícula				Larva - intestino				Larva - outros tecidos			
BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso	BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso	BestKeeper*	geNorm	NormFinder	consenso
GAPDH	B-ACT	GAPDH	B-ACT	RPS26	RPS26	RPS11	RPS11	GAPDH	ArgK	B-TUB	RPS11
EF1A	B-TUB	B-ACT	GAPDH	B-TUB	RPS11	RPS26	RPS26	RPS11	B-ACT	RPS26	RPS26
B-ACT	GAPDH	B-TUB	B-TUB	RPS3	B-TUB	EF1A	B-TUB	RPS3	RPS11	RPS11	B-TUB
ArgK	EF1A	EF1A	EF1A	RPS11	GAPDH	B-TUB	GAPDH	RPS26	EF1A	GAPDH	GAPDH
B-TUB	ArgK	ArgK	ArgK	EF1A	RPS3	GAPDH	EF1A	EF1A	RPS26	EF1A	EF1A
-	RPS26	RPS3	RPS3	-	EF1A	RPS3	RPS3	B-TUB	B-TUB	ArgK	ArgK
-	RPS3	UBQ	UBQ	-	B-ACT	B-ACT	B-ACT	ArgK	GAPDH	RPS3	RPS3
-	UBQ	RPS26	RPS26	-	ArgK	ArgK	ArgK	B-ACT	RPS3	B-ACT	B-ACT
-	-	-	-	-	-	-	-	UBQ	UBQ	UBQ	UBQ

* Resultado não utilizado para análise pelo pacote RankAggreg pois não apresentou um ranking considerando todos os genes constitutivos estudados, impedindo a análise pelo programa.

1.5. Discussão

PCR quantitativa é a técnica mais comumente utilizada para medir a expressão gênica atualmente (Huggett et al., 2005) e, por definição, é baseada na análise de um gene alvo cuja expressão é relativamente normalizada à expressão de um gene controle (Kheirelseid et al., 2010). Esta técnica se tornou o método mais importante de quantificação de níveis de transcritos de mRNA devido aos seus atributos amplamente conhecidos, como alta sensibilidade, especificidade, acurácia e reprodutibilidade, bem superior aos métodos convencionais (Northern blot e PCR semiquantitativa) (Andersen et al., 2004; Willems et al., 2006; Hoogewijs et al., 2008; Langnaese et al., 2008;

Tatsumi et al., 2008; Bustin et al., 2009; Huis et al., 2010). A normalização é uma fase preliminar muito importante para os estudos de expressão gênica e requer a seleção de um controle que servirá de referência, o que pode ser influenciado em diferentes tecidos e tratamentos e poderia resultar numa interpretação incorreta dos resultados (Bustin, 2002; Tricarico et al., 2002). Assim, é importante assegurar que os genes escolhidos como referência tenham realmente um perfil de expressão estável nas condições nas quais os experimentos estão sendo conduzidos. Neste estudo, foram identificados e validados nove genes referência candidatos para experimentos de expressão gênica em tecidos de adultos e larvas de *A. grandis*.

Para ser um bom gene referência, três critérios devem ser considerados: primeiro, deve obter uma eficiência de amplificação similar aos genes alvo; segundo, deve ter um nível moderado de expressão; e terceiro, sua expressão deve ser estável em todas as amostras testadas. Infelizmente, é improvável que um único gene referência universal possa ser encontrado em todas as espécies, tecidos e condições experimentais (Bustin, 2000). Quase todos os genes, incluindo os genes constitutivos são regulados por outros. Assim, não é seguro deduzir a estabilidade de expressão de um gene constitutivo baseado nas informações conhecidas de regulação gênica.

A avaliação da estabilidade de expressão de genes constitutivos requer métodos matemáticos. Alguns algoritmos, como geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) e o método ΔC_t (Silver et al., 2006) foram desenvolvidos com este propósito. O método do ΔC_t não é uma boa escolha para seleção de genes referência porque é baseado no princípio de que a variação de expressão de dois genes constitutivos deve ser idêntica em todas as amostras e em todas as condições experimentais ou tipos de células. Além disso, os procedimentos computacionais deste método são pesados (Silver et al., 2006). geNorm, NormFinder e BestKeeper são três softwares livremente disponíveis e foram usados para avaliar a estabilidade de expressão dos genes candidatos a referência. O presente trabalho demonstra que estas ferramentas permitem a

criação de um procedimento de validação com uma ampla gama de genes referência candidatos.

Neste trabalho foram utilizados nove genes considerados constitutivos como candidatos a referência que foram analisados através dos três programas mais amplamente utilizados, BestKeeper, geNorm e NormFinder. Por meio das análises realizadas, podemos constatar que muitos dos genes constitutivos de *A. grandis* não deveriam ser utilizados como genes referência por causa da variação nos níveis de expressão em diferentes tecidos. Nossos resultados indicam que a estabilidade de expressão dos genes referência deve ser validada para cada condição experimental sob investigação. O ranking dos genes candidatos geralmente varia entre o BestKeeper, geNorm e NormFinder porque estes programas apresentam diferentes algoritmos e sensibilidades para a co-regulação dos genes. Entretanto, os programas identificaram um grupo similar de genes referência para cada um dos tecidos utilizados (Tabela 3; Figura 4 e 6).

Como os programas utilizados possuem diferenças entre si não permitindo compará-los, foi realizada uma análise matemática adicional utilizando um pacote estatístico que compara listas que não são comparáveis de outra forma (RankAggreg) com o objetivo de criar uma lista consenso entre os programas utilizados. Entretanto a maior parte dos resultados obtidos pelo BestKeeper não pôde ser utilizado visto que o pacote RankAggreg exige o mesmo número de amostras avaliadas para poder criar uma lista consenso, o que não foi obtido na maioria das amostras analisadas pelo BestKeeper (com exceção da cabeça da larva e outros tecidos larvais, ver Tabela 5). Isto se deve ao fato de que, para um resultado mais acurado pelo BestKeeper, deve-se excluir da análise os genes que obtiveram o desvio padrão maior que 1. Isto feito, alguns genes candidatos não foram representados nos resultados obtidos por este programa (Tabela 3) e, assim, não foram utilizados para a análise consenso (Tabela 5).

É importante notar que o geNorm, além de calcular a estabilidade de expressão dos genes referência candidatos, também calcula o valor V , que

indica se a inclusão de um gene referência extra adiciona estabilidade ao fator de normalização, levando em consideração que o programa calcula que, pelo menos, dois genes devem ser obrigatoriamente usados. No caso do presente estudo, as análises para o cérebro do inseto adulto demonstraram que a adição de um quarto gene é prejudicial à normalização, visto que o valor de V é superior a 0,15 (Figura 5). Entretanto, de maneira geral, este dado não é negativo, visto que a maior parte dos estudos publicados que utilizam a ferramenta de qRT-PCR para análise de expressão gênica em insetos, utilizam, no máximo três genes referência na normalização dos dados (Wang et al., 2012; Wu et al., 2012; Wynant et al., 2012; Xu et al., 2012; Irlles et al., 2013; Kettles et al., 2013; Toprak et al., 2013).

1.6. CONCLUSÕES

Em suma, o presente estudo apresenta uma lista de genes referência mais estáveis em diferentes tecidos de larvas e adultos de *A. grandis* a serem utilizados em estudos futuros (em adultos, aparelho reprodutor feminino, aparelho reprodutor masculino, cérebro, cutícula e intestino; e em larvas, cabeça, cutícula, intestino e outros tecidos). Foi demonstrado que nem todos os genes são estávelmente expressos em todos os tecidos e órgãos de *A. grandis*. A maneira mais confiável de escolha de genes constitutivos como genes referência é validar sua estabilidade de expressão utilizando algoritmos, como o geNorm e NormFinder, e fazer uma análise consenso entre os resultados apresentados por eles. Desta forma, este trabalho fornece uma base sólida para futuros estudos de perfil de expressão gênica em diferentes órgãos de *A. grandis*.

1.7. REFERÊNCIAS

Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64:5245-5250.

- Aoki, T., Naka, H., Katagiri, T., and Hirono, I. 2000. Cloning and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 66:737-742.
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., and Clark, B.J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics* 21:389-395.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29:23-39.
- Bustin, S.A., and Nolan, T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15:155-166.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34:597-601.
- Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S.B., Olsvik, P.A., Penning, L.C., and Toegel, S. 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology* 7 - 74 11:1-5.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611-622.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139:5-17.
- de Almeida, M.R., Ruedell, C.M., Ricachenevsky, F.K., Sperotto, R.A., Pasquali, G., and Fett-Neto, A.G. 2010. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC Molecular Biology* 11:73.
- Ellers, J., Marien, J., Driessen, G., and van Straalen, N.M. 2008. Temperature-induced gene expression associated with different thermal reaction norms for growth rate. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 310:137-147.
- Foss, D.L., Baarsch, M.J., and Murtaugh, M.P. 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal Biotechnology* 9:67-78.
- Gachon, C., Mingam, A., and Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany* 55:1445-1454.

- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30:503-512.
- Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., and Gutierrez, L. 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany* 60:487-493.
- Hong, S.-Y., Seo, P., Yang, M.-S., Xiang, F., and Park, C.-M. 2008. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* 7 - 112 8:1-11.
- Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J., and Vanfleteren, J. 2008. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Molecular Biology* 9:9.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., and Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity* 6:279-284.
- Huis, R., Hawkins, S., and Neutelings, G. 2010. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biology* 7 - 71 10:1-14.
- Irles, P., Silva-Torres, F.A., and Piulachs, M.-D. 2013. RNAi reveals the key role of Nervana 1 in cockroach oogenesis and embryo development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:178-188.
- Kettles, G.J., Drurey, C., Schoonbeek, H.J., Maule, A.J., and Hogenhout, S.A. 2013. Resistance of *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. *New Phytologist* 198:1178-1190.
- Kheirleiseid, E., Chang, K., Newell, J., Kerin, M., and Miller, N. 2010. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Molecular Biology* 7 - 12 11:1-13.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoberg, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., and Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27:95-125.
- Langnaese, K., John, R., Schweizer, H., Ebmeyer, U., and Keilhoff, G. 2008. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology* 7 - 53 9:1-15.
- Lee, P.D., Sladek, R., Greenwood, C.M., and Hudson, T.J. 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research* 12:292-297.
- Lefever, S., Hellemans, J., Pattyn, F., Przybylski, D.R., Taylor, C., Geurts, R., Untergasser, A., and Vandesompele, J. 2009. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37:2065-2069.
- Lord, J.C., Hartzler, K., Toutges, M., and Oppert, B. 2010. Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge. *Journal of Microbiological Methods* 80:219-221.

- Mallona, I., Lischewski, S., Weiss, J., Hause, B., and Egea-Cortines, M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology* 10:4.
- Migocka, M., and Papierniak, A. 2011. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Molecular Breeding* 28:343-357.
- Muller, W.E., Grebenjuk, V.A., Thakur, N.L., Thakur, A.N., Batel, R., Krasko, A., Muller, I.M., and Breter, H.J. 2004. Oxygen-controlled bacterial growth in the sponge *Suberites domuncula*: toward a molecular understanding of the symbiotic relationships between sponge and bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 70:2332-2341.
- Olsvik, P.A., Lie, K.K., Jordal, A.E., Nilsen, T.O., and Hordvik, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology* 6:21.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26:509-515.
- Pihur, V., and Datta, S. 2009. RankAggreg, an R package for weighted rank aggregation. *BMC Bioinformatics* 10:62.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., and Lund, S.T. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6:27.
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijssen, D., Vangronsveld, J., and Cuypers, A. 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227:1343-1349.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132:365-386.
- Sappington, T.W., and Spurgeon, D.W. 2000. Preferred Technique for Adult Sex Determination of the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93:610-615.
- Schmittgen, T.D., and Zakrajsek, B.A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46:69-81.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., and Thein, S. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 7:1-9.
- Snell, T.W., Brogdon, S.E., and Morgan, M.B. 2003. Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 12:475-483.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., and Crawford, D.R. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29:332-337.
- Tatsumi, K., Ohashi, K., Taminishi, S., Okano, T., Yoshioka, A., and Shima, M. 2008. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 374:106-110.

- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75:291-295.
- Toprak, U., Baldwin, D., Erlandson, M., Gillott, C., Harris, S., and Hegedus, D.D. 2013. In vitro and in vivo application of RNA interference for targeting genes involved in peritrophic matrix synthesis in a lepidopteran system. *Insect Science* 20:92-100.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., and Orlando, C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry* 309:293-300.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:RESEARCH0034.
- von Smolinski, D., Leverkoehne, I., von Samson-Himmelstjerna, G., and Gruber, A.D. 2005. Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. *Histochemistry and Cell Biology* 124:177-188.
- Wang, G.-H., Xia, Q.-Y., Cheng, D.-J., Duan, J., Zhao, P., Chen, J., and Zhu, L. 2008. Reference genes identified in the silkworm *Bombyx mori* during metamorphosis based on oligonucleotide microarray and confirmed by qRT-PCR. *Insect Science* 15:405-413.
- Wang, Y., Fan, H.-W., Huang, H.-J., Xue, J., Wu, W.-J., Bao, Y.-Y., Xu, H.-J., Zhu, Z.-R., Cheng, J.-A., and Zhang, C.-X. 2012. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42:637-646.
- Willems, E., Mateizel, I., Kemp, C., Cauffman, G., Sermon, K., and Leyns, L. 2006. Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells. *Int. J. Dev. Biol.* 50:627 - 635.
- Wu, W.-J., Wang, Y., Huang, H.-J., Bao, Y.-Y., and Zhang, C.-X. 2012. Ecdysone receptor controls wing morphogenesis and melanization during rice planthopper metamorphosis. *Journal of Insect Physiology* 58:420-426.
- Wynant, N., Verlinden, H., Breugelmans, B., Simonet, G., and Vanden Broeck, J. 2012. Tissue-dependence and sensitivity of the systemic RNA interference response in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42:911-917.
- Xu, J., Raman, C., Zhu, F., Tan, A., and Palli, S.R. 2012. Identification of nuclear receptors involved in regulation of male reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Physiology* 58:710-717.
- Zhang, Z., and Hu, J. 2007. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. *Toxicological Sciences* 95:356-368.

- Zhao, S., and Fernald, R.D. 2005. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Computational Biology* 12:1047-1064.
- Zientz, E., Beyaert, I., Gross, R., and Feldhaar, H. 2006. Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6027-6033.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO SILENCIAMENTO DA VITELOGENINA NA REPRODUÇÃO DE *Anthonomus grandis*



Resumo

A Vitelogenina (Vtg) é a proteína precursora do vitelo, que é a principal fonte de nutriente do ovo e está envolvida na reprodução dos insetos. Apesar de se saber que *Anthonomus grandis* é um inseto de reprodução sexuada e que também produz Vtg durante sua fase reprodutiva, ainda não se sabe em quais fatores esta proteína é importante no processo reprodutivo deste inseto. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do silenciamento gênico da Vitelogenina de *A. grandis* (AgVtg) no inseto adulto e na sua progênie. Para isto, foram realizados os estudos para verificar a presença de transcritos em diferentes fases do desenvolvimento do inseto através de qRT-PCR, além da imunolocalização da proteína em oócitos em desenvolvimento. Após microinjeção de 500 ng de dsRNA da AgVtg em fêmeas recém-emergidas de *A. grandis*, foi verificada uma significativa diminuição no acúmulo de transcritos 24, 48 e 72 horas após a microinjeção. Além disto, verificou-se que as fêmeas tratadas com o dsRNA são capazes de produzir ovos semelhantemente aos tratamentos controle, porém, a maior parte dos ovos era inviável. Foram realizados estudos por meio de microscopia dos ovos oriundos de fêmeas submetidas à microinjeção. Os ovos do tratamento de microinjeção de dsRNA de AgVtg apresentaram fenótipos variáveis, indicando que o desenvolvimento do embrião foi bloqueado em diferentes estágios embrionários do inseto. Isto provavelmente ocorreu devido a diferentes quantidades de vitelo nos ovos gerados por diferentes níveis de silenciamento.

Palavras-chave: bicudo-do-algodoeiro, RNAi, reprodução.

2.1. INTRODUÇÃO

O bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* é uma das pragas mais importantes do algodão nas Américas. O desenvolvimento larval se dá totalmente no interior dos botões, num período de sete a 12 dias (Gallo et al., 2002). Terminando o ciclo da cultura, parte da população migra para abrigos naturais sob restos de vegetais secos, entra em diapausa ou hibernação, que podem durar meses, por períodos variáveis de 150 a 180 dias até um novo ciclo da cultura (Gallo et al., 2002). O bicudo é um inseto de reprodução sexuada e possui uma grande capacidade reprodutiva, tornando-o um problema ainda mais sério quando coloniza as lavouras de algodão. Conseqüentemente, o conhecimento a respeito da reprodução deste inseto é essencial para o desenvolvimento racional de ferramentas de controle.

A vitelogenina (Vtg) é o precursor da proteína do ovo conhecida como vitelo, que fornece reservas de energia para vertebrados e invertebrados ovíparos. Em muitas espécies de insetos, as Vtgs são sintetizadas nos corpos gordurosos e secretadas para a hemolinfa, sendo então sequestradas por oócitos competentes pelo processo de endocitose mediada por receptor (Raikhel e Dhadialla, 1992; Snigirevskaya et al., 1997; Sappington e Raikhel, 1998). O vitelo é a principal fonte de nutrientes para o embrião, tendo assim, um papel importante da reprodução destes organismos. O vitelo é também um importante fator de proliferação populacional de pragas. Sabe-se que *A. grandis* possui duas subunidades de proteína vitelínica na fase de ovo, relatadas como YP₄₇ e YP₁₆₀, pois migram em gel desnaturante de poli-acrilamida com um tamanho aparente de 47 e 160 kDa, respectivamente (Trewitt et al., 1992). No entanto, apenas um gene que codifica esta proteína foi encontrado em fêmeas, sendo a sua sequência de RNAm de 10.017 pb (GenBank, número de acesso: M72980.1).

O RNA interferente (RNAi) é um processo recentemente descoberto que resulta na diminuição da expressão gênica em larga escala em organismos eucariotos. Neste processo, existe uma maquinaria celular onde, a partir de um RNA dupla-fita (dsRNA) o acúmulo de transcritos homólogos de um gene cognato é diminuído especificamente (Fire et al., 1998). Assim, o RNAi tem se

tornado uma grande ferramenta nos estudos de genômica funcional de insetos (Kennerdell e Carthew, 1998; Hannon, 2002; Hutvágner e Zamore, 2002).

Foram realizados estudos demonstrando a síntese e captura de Vtg em *A. grandis* (Taub-Montemayor e Rankin, 1997), no entanto, ainda não existem dados que demonstrem qual o impacto da redução dos níveis do transcrito desta proteína no sucesso reprodutivo deste inseto. Este conhecimento é de grande relevância científica tendo em vista a compreensão mais minuciosa dos processos nos quais esta proteína está envolvida em geral, assim como na prospecção de moléculas para o uso no controle de *A. grandis*.

2.2. OBJETIVOS

- Caracterizar a vitelogenina de *A. grandis* por meio de quantificação de transcritos e citolocalização da proteína;
- Verificar os efeitos biológicos decorrentes do silenciamento gênico da vitelogenina em fêmeas de *A. grandis*;
- Caracterizar o fenótipo da progênie decorrente do silenciamento gênico da vitelogenina neste inseto.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Insetos

Ovos, larvas e adultos de *A. grandis* foram obtidos do Laboratório de bioecologia e semioquímicos de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF. A colônia é mantida em dieta artificial a 28 ± 2 °C de temperatura, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Uma breve metodologia de criação dos insetos é descrita a seguir: os adultos são mantidos com dieta artificial gaiolas feitas de potes plásticos de 2 L com o fundo substituído por uma tela, por onde caem os ovos. Estes são coletados e distribuídos em placas de Petri contendo dieta artificial numa densidade de aproximadamente 200 ovos por placa. As larvas eclodidas permanecem nas placas de Petri contendo dieta até empupar, quando são transferidas para as gaiolas de acasalamento. A sexagem dos adultos foi realizada pela observação dos órgãos sexuais externos, como descrito por Sappington e Spurgeon (2000).

2.3.2. Determinação do número de ínstaes de *A. grandis*

Para a determinação e caracterização dos ínstaes larvais de *A. grandis*, dez larvas foram coletadas durante cada um dos treze dias do desenvolvimento larval. A coleta foi feita em três períodos diferentes. As larvas foram acondicionadas em tubos de plástico de 15 mL contendo solução fixadora (Solução de Pampel: 44% etanol; 4% formaldeído; 6% Ácido acético), fervidas por um minuto e deixadas em descanso por no mínimo 24 horas. Após esse

período as cápsulas cefálicas foram fotografadas e suas medidas foram obtidas pelo programa Image Tool versão 3.0. Os comprimentos das cápsulas cefálicas foram analisados pelo programa Hcap para determinação dos instares larvais de *A. grandis*.

2.3.3. Quantificação relativa do nível do transcrito de Vitelogenina durante o desenvolvimento de *A. grandis*

Para a realização da quantificação relativa dos transcritos de Vitelogenina, o RNA total de ovos, larvas de 1^o, 2^o e 3^o instares, pupas, machos e fêmeas adultas (de diferentes idades) de *A. grandis* foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados em torno de 200 ovos, e dez indivíduos para cada estágio larval, pupas, machos e fêmeas. Para síntese de cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com 2U de DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com instruções do fabricante. Após etapa de limpeza em coluna do kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) e verificação da qualidade da amostra em eletroforese em gel de agarose 1,5%, a concentração de RNA foi determinada em um fluorômetro Qubit, utilizando o kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies). A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit Superscript IIITM First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen), a partir de 500 ng de RNA total, seguindo orientações do fabricante.

Os oligonucleotídeos iniciadores (doravante chamados de *primers*) foram desenhados a partir das sequências de nucleotídeos de cada gene disponíveis no banco de dados (Tabela 1) (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para realização da qRT-PCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando *primers* específicos para cada gene. Os genes utilizados para normalização foram o do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina (B-TUB), de acordo com estudos previamente conduzidos no laboratório (Capítulo anterior) utilizando os *primers* GAPDH-FW e GAPDH-RV e B-TUB_FW e B-TUB_RV, respectivamente, indicados na Tabela 1. Cada reação foi feita num volume final de 10 μ L, sendo 5 μ L de SYBR Green PCR Mix (LGC), 2 μ L de cDNA, 2,6 μ L de H₂O bi-

destilada e cada *primer* a 0,2 μ M (direto e reverso). Os ciclos de tempo e temperatura utilizados foram: 95 °C por 10 min., seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada *primer* (60-94 °C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de *primers* ou contaminação da amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata e controles negativos, contendo água em vez de cDNA, foram incluídos para verificar contaminações.

Tabela 1. Lista dos *primers* utilizados neste trabalho.

Gene alvo	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Objetivo
Vitелogenina	BW_vitell_RTFor	TCA TCA AAT CTA TAT GGC TGG TTA TGA C	221	qRT-PCR
	BW_vitell_RTRev	GCT ACA GGA CTA ATT GCC ATA ACA TCA C		
GAPDH	qPCR_AgGAPDH_FW	AGA TCG TCG AGG GTC TGA TG	166	qRT-PCR
	qPCR_AgGAPDH_RV	AAG GCG GGA ATG ACT TTA CC		
B-TUB	qPCR_AgBTUB_FW	GGT TGC GAC TGT TTA CAA GG	156	qRT-PCR
	qPCR_AgBTUB_RV	GCA CCA CCG AGT AAG TGT TC		
Vitелogenina	AgVtg_FW	<u>GGGG ACA AGT TTG TAC AAA</u> <u>AAA GCA GGC TGG - TCA TCA</u> AAT CTA TAT GGC	401	Clonagem
	AgVtg_RV	<u>GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA</u> <u>AGC TGG GTG - ATT TGT CCC</u> ATAATT GTT		

Nota: Os sítios de recombinação Gateway estão sublinhados.

A eficiência de cada *primer* para cada reação e os ciclos limiars (do inglês cycle threshold - Cqs) foram calculados individualmente a partir do software on-line qPCR miner, <http://www.miner.ewindup.info> (Zhao e Fernald, 2005). A expressão relativa de cada gene foi calculada de acordo com o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), que corrige a eficiência de cada *primer*, utilizando o programa qBase plus (Biogazelle, Bélgica).

2.3.4. Citolocalização da proteína da Vitelogenina em fêmeas de *A. grandis*

Para a realização da citolocalização da proteína Vitelogenina em fêmeas de *A. grandis*, insetos adultos foram fixados em 4% de paraformaldeído, desidratados em concentrações crescentes de etanol e embebidos em Paraplast® (Invitrogen), segundo descrito por Vieira et al. (Vieira et al., 2012).

O seccionamento dos blocos de Paraplast contendo fêmeas de *A. grandis* foi feito em micrótomo a 10 µm de espessura. Os cortes foram colocados em gotas de água destilada sobre lâminas de vidro revestidas por polilisina, e secos em placa quente a aproximadamente 50°C, para que os cortes ficassem bem aderidos às lâminas. As lâminas contendo material biológico foram então acondicionadas em caixas a temperatura ambiente até o uso para citolocalização.

Para a etapa de citolocalização propriamente dita, as lâminas foram tratadas por 30 minutos com Histoclear® (National Diagnostics) para a remoção da parafina e em seguida, lavadas por mais 30 minutos em etanol absoluto para a remoção do Histoclear e melhor acesso do anticorpo à proteína de interesse. Os cortes foram observados sob microscópio para verificar se a parafina foi removida por completo e em seguida, as lâminas foram submetidas à reidratação seriada em etanol de 100%, 85%, 70%, 50%, 30% e 15% e finalmente colocadas em tampão PIPES 50 mM (pH 6,9). Sob cada lâmina, foi colocado aproximadamente 200 µL de solução de bloqueio (SB) (1% de soro de albumina bovino em PIPES 50 mM, pH 6,9), coberta por uma lamínula e incubadas por no mínimo 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Os anticorpos primário (AC1) e secundário (AC2) foram diluídos 300 vezes em solução de bloqueio contendo 0,2% de DMSO. Os anticorpos foram incubados a 37°C por 30 minutos e centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm. Este passo evita a ligação inespecífica do BSA ao anticorpo. As lamínulas foram então retiradas cuidadosamente das lâminas e o SB foi substituído por aproximadamente 150 µL do AC1 ou soro pré-imune (controle negativo). As lâminas foram então cobertas com lamínula e colocadas em câmara úmida

para incubação por 16 horas a 4 °C. Após este período, a câmara úmida foi colocada a 37 °C (temperatura ótima para interação AC/antígeno) por 90 minutos. Subsequentemente, as lamínulas foram gentilmente retiradas e as lâminas lavadas por 30 minutos em tampão PIPES 50 mM (pH 6,9) sob agitação suave. O tampão foi então removido e imediatamente substituído por aproximadamente 200 µL do AC2 (Alexa 488, Abcam), coberto com lamínula e incubado por 3 horas a temperatura ambiente ou por 1 hora a 37 °C. Algumas lâminas foram incubados apenas com o AC2 como controle para verificar possível ligação inespecífica e outros com o soro pré-imune. As lâminas foram então lavadas novamente com tampão PIPES 50 mM (pH 6,9) protegidas da luz para evitar a perda da fluorescência. Em seguida, foi adicionado 200 µL de 1µg.mL⁻¹ de DAPI, para corar os núcleos, e incubados por 5 minutos, protegidos da luz. As lâminas foram então lavadas rapidamente em água destilada para retirar o excesso do fluorocromo e montadas em glicerol 90% para as observações sob o microscópio Zeiss Axioplan 2 utilizando o filtro para Alexa Fluor 488 (absorção 494 nm e emissão 517 nm) e para 4',6-diamidino-2-phenilindole (DAPI) (absorção 358 nm e emissão 461 nm).

2.3.5. Seleção do fragmento de DNA que codifica o gene da vitelogenina e clonagem em vetor plasmidial

Utilizando sequências disponíveis no banco de dados (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), foi selecionado um fragmento de 400 pb do gene da vitelogenina de *A. grandis* (número de acesso GenBank: M72980) para clonagem e produção de dsRNA. Para utilizar com dsRNA controle nos experimentos de silenciamento, foi escolhido um fragmento de 393 pb do gene da β-glucoronidase (GUS) para clonagem.

Para assegurar que os propostos dsRNAs não sejam um risco a organismos não-alvo, as sequências dos fragmentos dos genes em questão foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTN (versão 2.2.15) (Altschul et al., 1990).

Inicialmente, para se obter a construção para a expressão de dsRNA homólogas as sequências referidas, foram desenhados *primers* (Tabela 1)

contendo os sítios attB1 e attB2 contendo a região mínima do promotor T7, que é necessário para a síntese do dsRNA.

Em seguida, foi realizada uma PCR utilizando *primers* específicos para a clonagem e sequenciamento do fragmento visando confirmação do fragmento. A PCR foi realizada nas seguintes condições: 94 °C por um minuto, temperatura de anelamento 55°C e extensão a 72 °C por um minuto por 30 ciclos. O produto de PCR foi então clonado em vetor pDONR™221 (Invitrogen) e enviado para sequenciamento. Após a confirmação da sequência, foi realizada a síntese de dsRNA.

2.3.6. Produção de dsRNA da Vitelogenina *in vitro*

A produção de RNAs fita dupla (dsRNAs) foi realizada a partir de processo de transcrição *in vitro*. Foram utilizados os mesmos *primers* específicos para a região (“Forward” e “Reverse”) do promotor T7 para a realização de PCR para amplificação do fragmento de AgVtg exigida para o kit de transcrição *in vitro* MEGAscript® T7 High Yield (Ambion®, Carlsbad, EUA). A síntese de dsRNA foi realizada utilizando 0,5 µg de produto de PCR como molde para um volume de reação de transcrição de 20 µL. A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C, seguido por tratamento com DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) por 15 minutos. Para alinhamento do dsRNA, os produtos da reação foram incubados a 70 °C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente. Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico. O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC, e a quantificação foi obtida por espectrofotometria. A figura 1 se refere a reação de transcrição *in vitro* para a produção do RNA dupla fita.

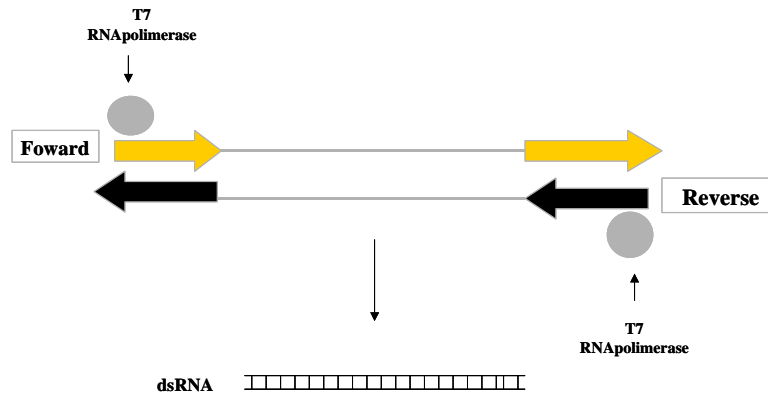


Figura 1. Desenho esquemático do processo de transcrição *in vitro* dos genes alvo utilizando o kit de transcrição MEGAscript® RNAi Kit (Ambion®).

2.3.7. Silenciamento gênico da Vitelogenina em fêmeas de *A. grandis*

Para os bioensaios de microinjeção, foram utilizadas fêmeas com 24 horas de emergência. Após a síntese de dsRNA para AgVtg *in vitro*, como descrito no item 4.5, o dsRNA foi diluído para a concentração de 500 ng. μL^{-1} . Na microinjeção foi utilizada uma microsseringa (Hamilton Co.), tipo Gastight com conexão Luer (LT), modelo 1701LT, volume 10 μL , com agulha de 51mm, gauge 26 S, estilo de ponta 4 e bisel de 12°.

As fêmeas foram mantidas a 4°C por aproximadamente 15 minutos, para diminuir o metabolismo, e, em seguida, microinjetadas na sua região abdominal dorsal, por baixo das asas (Figura 2). O volume injetado foi de 1 μL por fêmea.

O experimento feito em duplicata biológica e foi composto de três tratamentos: dsVtg, dsGUS e água bi-destilada e o desenho experimental está descrito na figura 3.

As fêmeas do grupo I permaneceram em placas de Petri apenas com dieta artificial. A cada 24 horas após a microinjeção, foram coletadas cinco fêmeas até 72 horas para a realização das análises de quantificação relativa dos transcritos do gene da Vtg por meio de qRT-PCR.



Figura 2. Foto da microinjeção na região abdominal dorsal de fêmea de *Anthonomus grandis*, utilizando seringa Hamilton de 10 μ L.

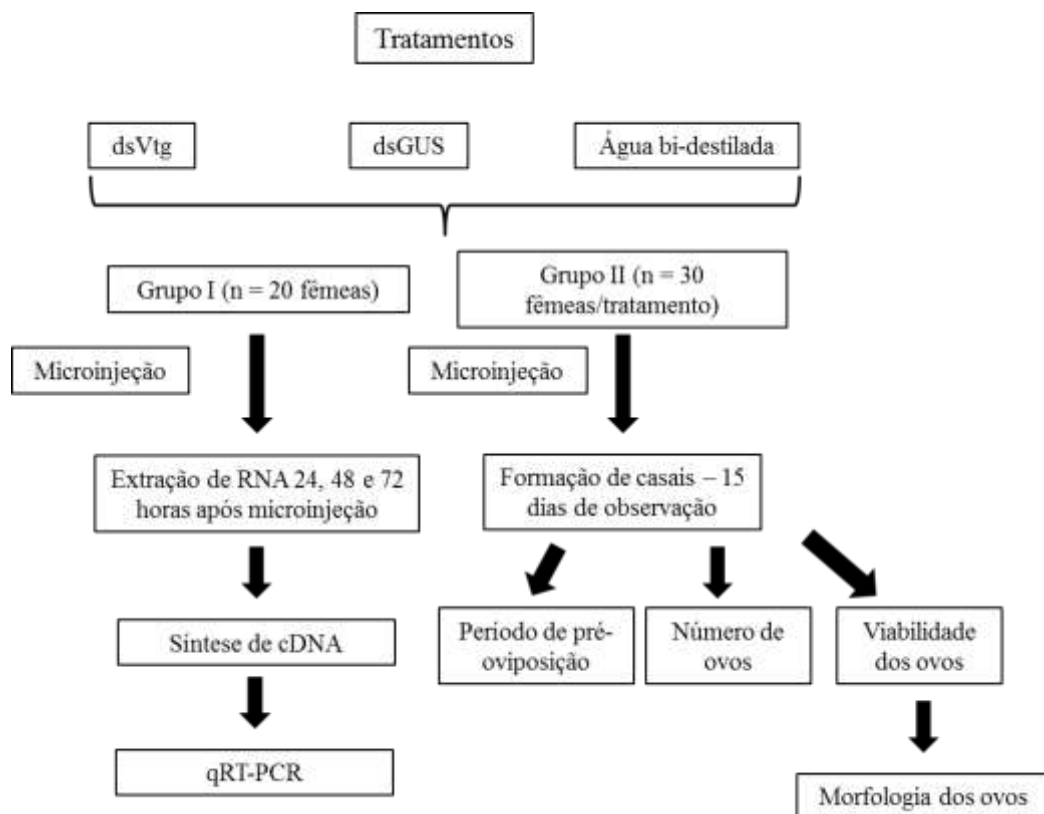


Figura 3. Esquema do desenho experimental.

As fêmeas do grupo II foram acasaladas e utilizadas para avaliação de parâmetros biológicos decorrentes do silenciamento gênico. As 30 fêmeas utilizadas por tratamento foram divididas em seis grupos de cinco e colocadas juntamente com cinco machos para permitir e acasalamento. Foram realizadas duas repetições biológicas, cada uma das quais constou de três grupos cinco casais.

Diariamente, os ovos foram coletados e acondicionados em câmara úmida composta por placa de Petri contendo papel filtro umedecido e coberto por um tecido preto (para permitir visualização dos ovos a olho nu), para permitir a eclosão. Por um período de 15 dias, onde se dá o pico de reprodução (este tempo foi verificado durante o próprio experimento), os ovos foram contados diariamente, bem como as larvas eclodidas. Foram então avaliados (1) período de pré-oviposição, (2) número de ovos, e (3) viabilidade dos ovos, o

que permitiu uma avaliação da fecundidade das fêmeas utilizadas no bioensaio.

2.3.8. Avaliação molecular do silenciamento gênico

Para avaliar o silenciamento dos transcritos-alvo pela técnica de RNA interferente nas fêmeas de *A.grandis*, foi utilizada a técnica de qRT-PCR. Para tal análise, foram sintetizados os cDNAs, a partir do RNA total extraídos de fêmeas de cada tratamento (água bi-destilada, dsGUS e dsVtg) 24, 48 e 72 horas após a microinjeção.

Para realização da qRT-PCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 1). Os genes utilizados para normalização foram o do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a β -tubulina (B-TUB), conforme citado anteriormente. O procedimento realizado foi semelhante ao descrito anteriormente.

2.3.9. Avaliação histológica dos ovos produzidos por fêmeas de *A. grandis* microinjetadas com dsVtg

Inicialmente, fêmeas microinjetadas com 500 ng de dsGUS, dsVtg e água bi-destilada, foram submetidas a acasalamento e os ovos produzidos foram coletados 48 horas após oviposição. Estes foram observados em estereomicroscópio e as imagens comparadas entre os tratamentos para a caracterização da morfologia externa dos ovos.

Em seguida, para a caracterização da morfologia interna dos ovos, fêmeas microinjetadas com 500 ng de dsGUS, dsVtg e água bi-destilada, foram submetidas a acasalamento e os ovos produzidos foram fixados e embebidos em Technovit®, seccionados em micrótomo e corados com DAPI e azul de toluidina e as imagens feitas com filtro para DAPI (absorção 358 nm e emissão 461 nm) e em campo claro, respectivamente, no microscópio Zeiss Axioplan 2.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Determinação do número de ínstaes de *A. grandis*

Com base nos resultados da medida do comprimento de cápsulas cefálicas de larvas de *A. grandis* foi possível a identificação de três ínstaes larvais descritos na Tabela II. O terceiro, e último instar larval foi o mais duradouro correspondendo a 61,5% de todo o período larval (Tabela 2). Esta etapa do trabalho é importante para verificar as diferenças intrínsecas da expressão gênica de cada ínstar do inseto.

Tabela 2. Medidas da cápsula cefálica de larvas de *Anthonomus grandis* para determinação do número de ínstaes.

Número do ínstar	Tamanho das amostras	Média ± DP (mm)	Faixa de tamanho (mm)
1º	75	0,3156 ± 0,03	0,27 – 0,35
2º	63	0,5269 ± 0,02	0,4 – 0,56
3º	218	1,0307 ± 0,05	0,86 – 1,16

Nota: DP: desvio padrão; Mínimo e máximo: valores mínimos e máximos das medidas das cápsulas cefálicas de larvas de *A. grandis*.

2.4.2. Quantificação da expressão relativa do transcrito da Vitelogenina durante o desenvolvimento de *A. grandis*

Visando melhor compreender a importância da proteína da vitelogenina no desenvolvimento e reprodução de *A. grandis*, foi realizada uma quantificação relativa da expressão deste gene via qRT-PCR. A quantidade relativa de transcrito de *AgVtg* detectada foi cerca de 500 vezes maior em fêmeas que em ovos, tendo sido também detectado o acúmulo de transcritos em machos. Por outro lado, o acúmulo nos machos foi cerca de 100 vezes maior que em ovo e cinco vezes menor que em fêmeas (Figura 4 A). Este alto acúmulo de transcritos de *AgVtg* em fêmeas é explicado pelo fato de esta ser uma proteína envolvida na reprodução, sendo a principal proteína estocada nos ovos de insetos (Klowden, 2007). A detecção de transcritos da vitelogenina em

machos de *A. grandis* reflete o que ocorre em outros insetos, onde também há o acúmulo desta proteína em machos (Valle, 1993).

Na quantificação relativa, feita apenas com fêmeas de três idades diferentes, verificou-se que o acúmulo de transcritos de *AgVtg* foi aproximadamente 30 vezes maior em fêmeas 96 HAE e apenas quatro vezes maior em fêmeas 72 HAE quando comparado com as mais jovens (48 HAE) (Figura 4 B). O maior acúmulo de transcritos de *AgVtg* em fêmeas mais velhas deve-se, provavelmente, ao início da vitelogênese, que só é iniciada quando o primeiro oócito atinge o vitelário (Triplehorn e Johnson, 2011).

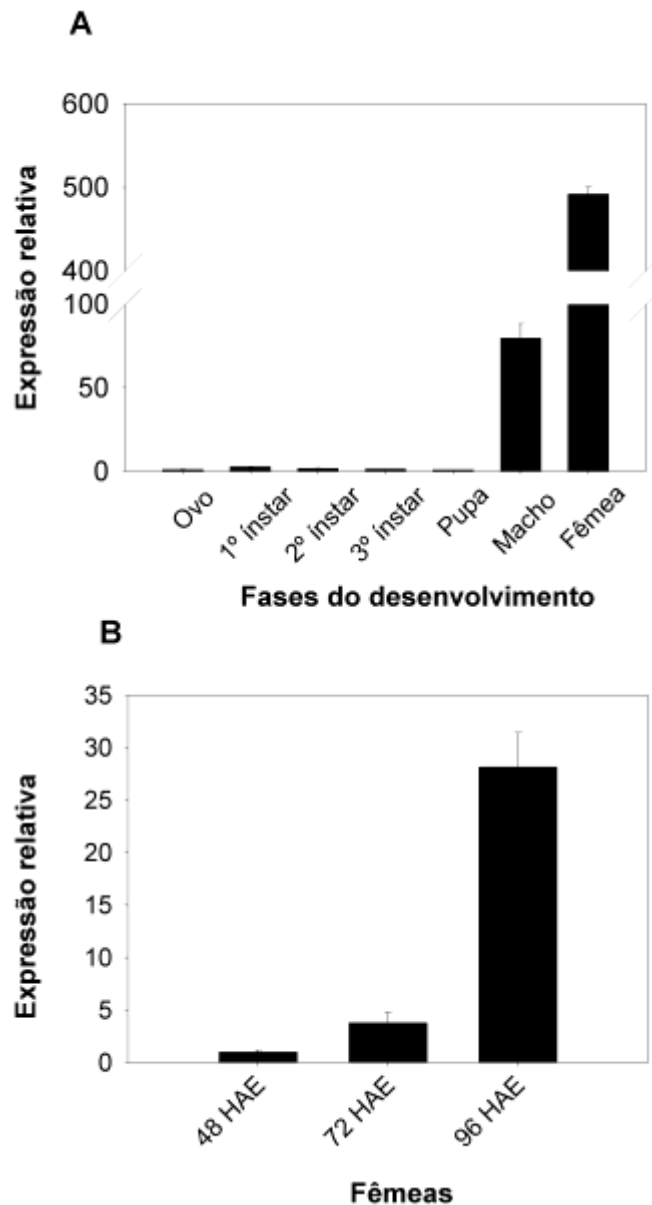


Figura 4. Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos da *Vitelogenina* em diferentes fases do desenvolvimento de *Anthonomus grandis*. A. Nível relativo de acúmulo de transcrito de *Vitelogenina* em ovos ($n = 200$), larvas de 1º, 2º e 3º ínstar, pupa e machos e fêmeas adultos ($n =$ dez de cada um destes estágios/estádios) de *A. grandis*. B. Nível relativo de acúmulo de transcrito de *Vitelogenina* em fêmeas de diferentes idades de *A. grandis* ($n = 10$). Os genes utilizados para normalização foram gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina.

2.4.3. Citolocalização da proteína da Vitelogenina em fêmeas de *A. grandis*

Para a imunolocalização da proteína Vitelogenina em fêmeas de *A. grandis*, insetos adultos foram fixados, embebidos em Paraplast® e os cortes de 10 µm submetidos ao protocolo padrão de imunolocalização. Foi utilizado o anticorpo Anti-Vtg de *T. castaneum* (Sheng et al., 2011) gentilmente cedido pelo Dr. Suba Pali (Universidade de Kentucky). Em análises utilizando ClustalW e Blastp, foi verificada uma identidade de 99% da sequência proteica de Vitelogenina de *A. grandis* (AAA27740.1) em relação à Vitelogenina de *T. castaneum* (XP_971398.1).

Toda a região abdominal de fêmeas de *A. grandis* foi utilizada na tentativa de detectar a presença da vitelogenina na hemolinfa ou nos corpos gordurosos (onde ela é sintetizada). Porém, os resultados mostraram que o sinal foi unicamente detectado no interior dos oócitos em desenvolvimento (Figura 5). Como a Vitelogenina não é presente nos oócitos na sua forma nativa, o sinal detectado, provavelmente, diz respeito ao Vitelo, forma de estoque desta proteína (Klowden, 2007).

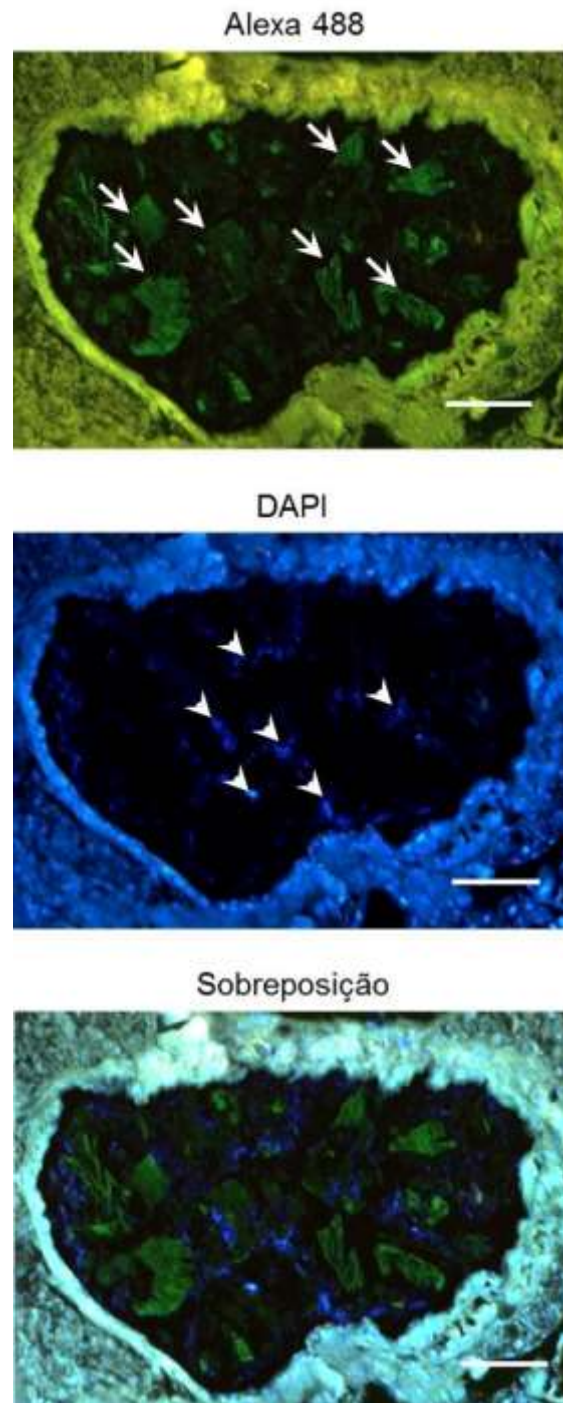


Figura 5. Imunolocalização da Vitelogenina em oócitos de *Anthonomus grandis*. Alexa 488: Imagem feita com filtro para Alexa Fluor (absorção 494 nm e emissão 517 nm) para detecção do sinal do anticorpo secundário Alexa 488 para detectar Vtg. Seta branca indica acúmulo da proteína. DAPI: Imagem feita com filtro para 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (absorção 358 nm e emissão 461 nm). Ponta de setas indicam DNA. Sobreposição: Imagem feita da sobreposição das duas imagens anteriores. Barra: 100 μ m.

2.4.4. Avaliação do silenciamento gênico – efeito da microinjeção de dsRNA da Vitelogenina na expressão gênica e na biologia de *A. grandis*

Para o experimento de silenciamento gênico, primeiramente, foi feita análise do acúmulo de transcritos por qRT-PCR de Vtg em fêmeas do grupo I entre 48, 72 e 96 horas após emergência (HAE) a cada 24 horas, levando em consideração foram utilizadas fêmeas de 24 HAE nos bioensaios. Foi verificado que, quando todos os tratamentos foram normalizados com os insetos do tratamento controle 24 horas após microinjeção, houve uma diminuição significativa no acúmulo de transcritos nos tratamentos do silenciamento gênico da Vtg (Figura 6). É possível verificar que as fêmeas microinjetadas com dsVtg 72 horas após o tratamento apresentaram o mesmo acúmulo de transcritos que as fêmeas do tratamento controle no início da fase adulta (Figura 6). Quando o silenciamento foi avaliado separadamente para cada intervalo de tempo, comparando cada intervalo com o seu respectivo controle, é possível verificar que 24 horas após a microinjeção, houve uma diminuição do número de transcritos no tratamento dsVtg em cerca de 9 vezes (Figura 7 A). Próximo do resultado obtido 48 horas após a microinjeção, onde as fêmeas submetidas ao tratamento com dsVtg resultaram em uma diminuição no acúmulo de transcritos em cerca de 8 vezes, comparando com o controle correspondente (Figura 7 B). Já com 72 horas após a microinjeção, as fêmeas submetidas ao tratamento com dsVtg, apresentaram uma redução de aproximadamente 30 vezes do acúmulo de transcritos do gene alvo (Figura 7 C). Este resultado mostra que o efeito de silenciamento se mantém até, pelo menos, 72 horas após microinjeção.

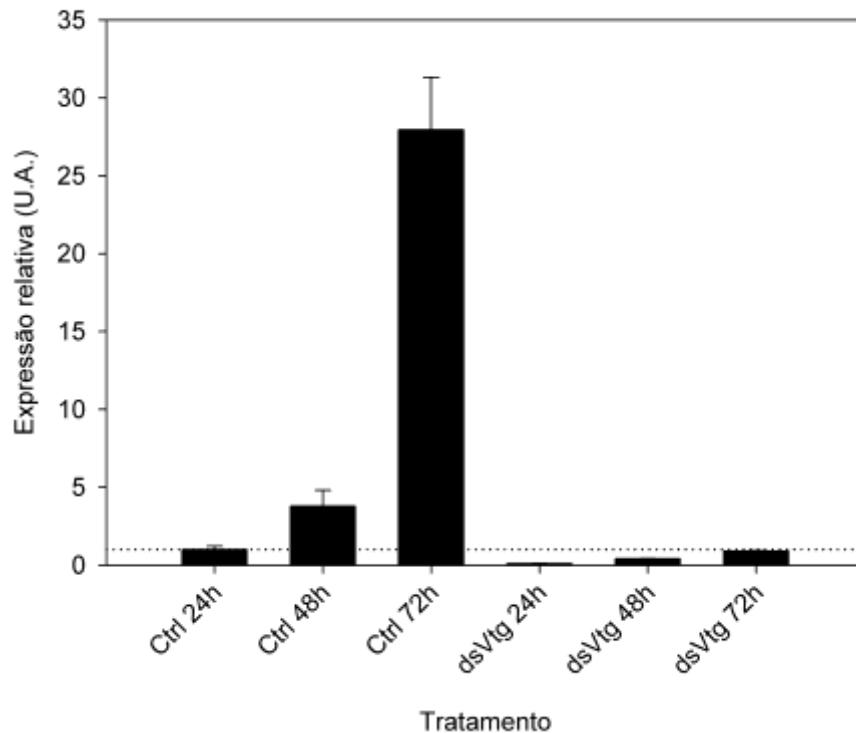


Figura 6. Quantificação do acúmulo de transcritos por qRT-PCR da Vitelogenina em fêmeas de *Anthonomus grandis* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após microinjeção de 500 ng de dsRNA para Vitelogenina. O tratamento controle constou de microinjeção com água e dsGUS analisados em conjunto. Nos experimentos, foram utilizadas fêmeas de 24 horas após emergência. Ctrl 24h: tratamento controle 24 horas após microinjeção; Ctrl 48h: tratamento controle 48 horas após microinjeção; Ctrl 72h: tratamento controle 72 horas após microinjeção; dsVtg 24h: tratamento do silenciamento da Vitelogenina 24 horas após microinjeção; dsVtg 48h: tratamento do silenciamento da Vitelogenina 48 horas após microinjeção; dsVtg 72h: tratamento do silenciamento da Vitelogenina 72 horas após microinjeção. Linha de referência: 1, unidade arbitrária. Os genes utilizados para normalização foram gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina.

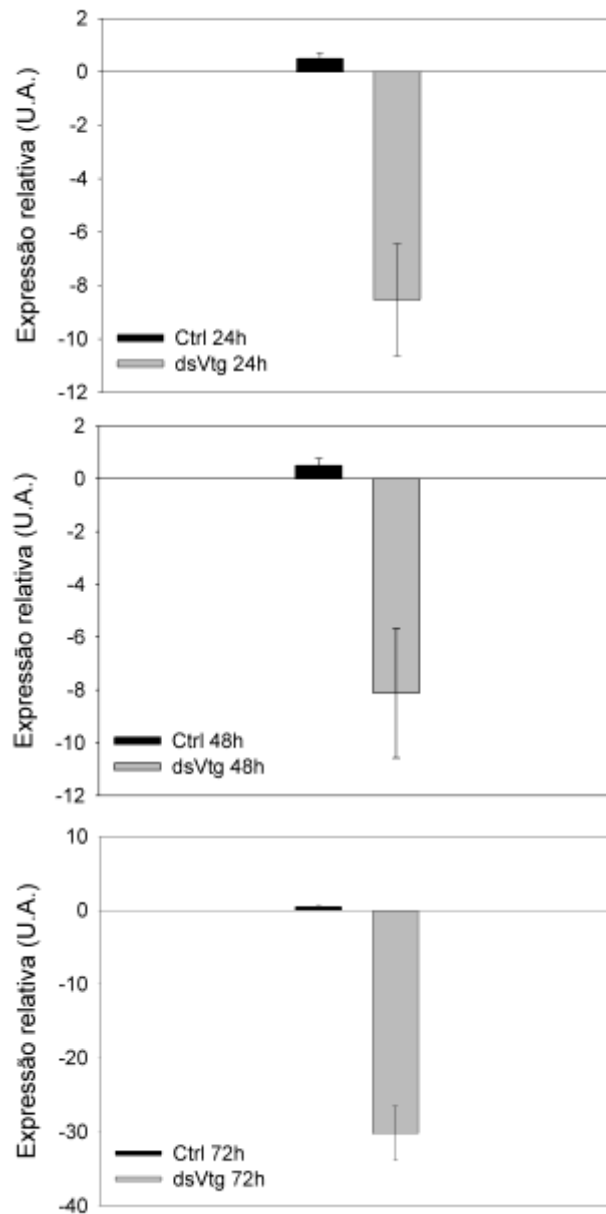


Figura 7. Quantificação do acúmulo de transcritos por qRT-PCR da Vitelogenina em fêmeas de *Anthonomus grandis* após microinjeção de 500 ng de dsRNA para Vitelogenina. O tratamento controle constou de microinjeção com água e dsGUS analisados em conjunto. A) Expressão relativa da vitelogenina em fêmeas 24 horas após microinjeção (24h); B) Expressão relativa da vitelogenina em fêmeas 48 horas após microinjeção (48h); C) Expressão relativa da vitelogenina em fêmeas 72 horas após microinjeção (72h). Ctrl: tratamento controle. Os genes utilizados para normalização foram gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -tubulina.

Observando-se os parâmetros biológicos do grupo II estudado (fêmeas submetidas à microinjeção para avaliação biológica), foi verificado que o período de pré-oviposição foi estatisticamente igual entre os tratamentos, numa média de quatro dias (Figura 8 A). Sendo que o silenciamento gênico da vitelogenina não provocou nenhuma variação neste parâmetro biológico.

Quanto ao número médio de ovos por repetição, não foi observada diminuição na média de ovos das fêmeas submetidas ao dsVtg em relação aos controles. Pelo contrário, o número médio de ovos foi semelhante em todos os tratamentos, variando em torno de 30 ovos durante 15 dias de observações (Figura 8 B). No entanto, quando foi avaliada a viabilidade dos ovos, verifica-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos controles (entre 35% e 42%, no controle com dsGUS e água, respectivamente), mas os ovos advindos de fêmeas microinjetadas com dsVtg tiveram uma viabilidade de menos de 1%, como pode ser observado na Figura 8 C. Assim, apesar de não impedir a oviposição de fêmeas de *A. grandis*, o silenciamento da vitelogenina reduziu a viabilidade dos ovos a menos de 1%. Além disso, a interferência prolongada na viabilidade dos ovos indicou que existiu uma durabilidade do silenciamento de AgVtg, pelo menos, dentro do período avaliado.

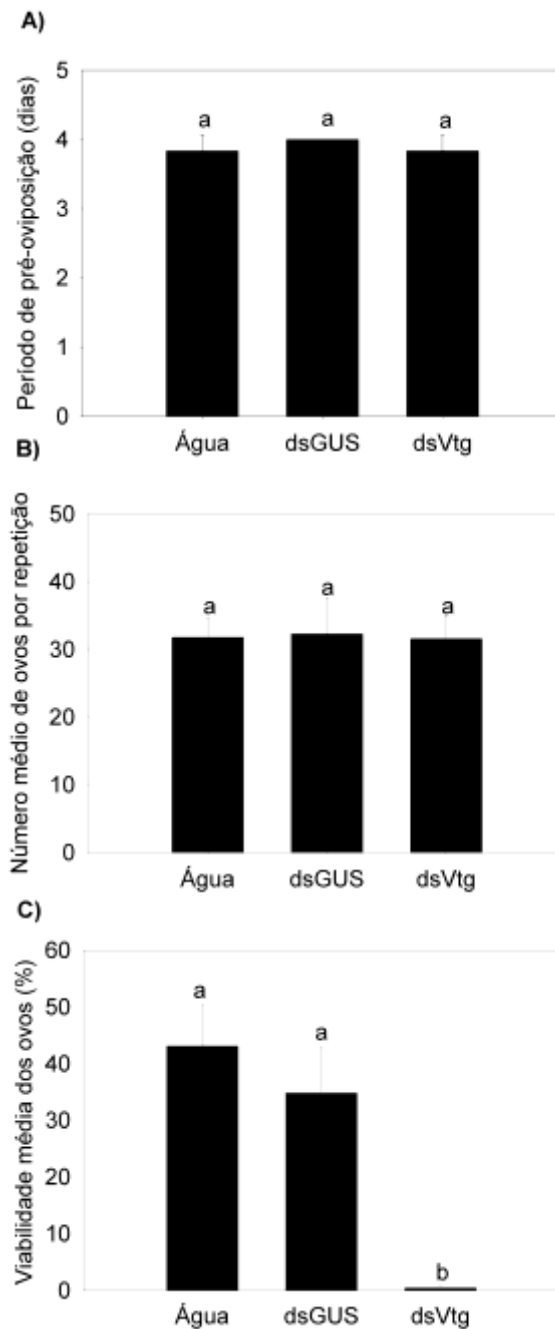


Figura 8. Dados biológicos do bioensaio de silenciamento do gene da Vitelogenina em fêmeas de *Anthonomus grandis*. A) Período médio de pré-oviposição de fêmeas de *A. grandis*; B) Número médio de ovos por repetição composta por cinco casais de *A. grandis* durante 15 dias de observação. C) Viabilidade média dos ovos por repetição composta por cinco casais de *A. grandis*. Os ovos foram acompanhados por até cinco dias após a última oviposição. Concentração final de dsRNA (GUS e Vtg): 500 ng. Análise estatística utilizando ANOVA e médias comparadas pelo teste de Tukey. Mesma letra não apresenta diferença significativa a 5% de probabilidade.

2.4.5. Avaliação histológica dos ovos depositados por fêmeas submetidas ao silenciamento gênico da Vitelogenina

Diante do resultado biológico mostrando que a viabilidade dos ovos foi negativamente afetada quando o gene da Vtg foi silenciado, fez-se necessário um estudo mais detalhado da histologia dos ovos depositados nos experimentos.

Quanto à morfologia externa, os ovos de 48 horas oriundos dos tratamentos controle apresentavam aparente desenvolvimento embrionário normal, sendo possível observar a segmentação do embrião que se desenvolvia no seu interior (Figura 9). Entretanto, os ovos oriundos do tratamento de microinjeção com dsVtg pareciam abortados, apresentando um aglomerado de tecido dentro do ovo, além de apresentar-se mais transparente que o controle, provavelmente pela menor quantidade de vitelo, que deixa a imagem mais turva. (Figura 9).

Diante destas observações, fez-se necessária a caracterização da morfologia interna dos ovos para verificar até que ponto ocorria desenvolvimento embrionário nos indivíduos submetidos à silenciamento. A análise das imagens dos ovos oriundos de fêmeas submetidas à microinjeção revela que, os ovos, 96 horas após oviposição, apresentaram uma diversidade de fenótipos que envolvem: (1) Bloqueio do desenvolvimento embrionário em fases iniciais, caracterizado pela baixa organização celular observada (Figuras 10 A, A', B, B'). (2) bloqueio do desenvolvimento do embrião em fase mais avançada, caracterizada pela presença de estruturas mais organizadas, como por exemplo peças bucais (Figura 10 C e C'). No entanto, este embrião apresenta apenas uma segmentação discreta em parte do corpo do embrião, sendo importante destacar que não houve eclosão.

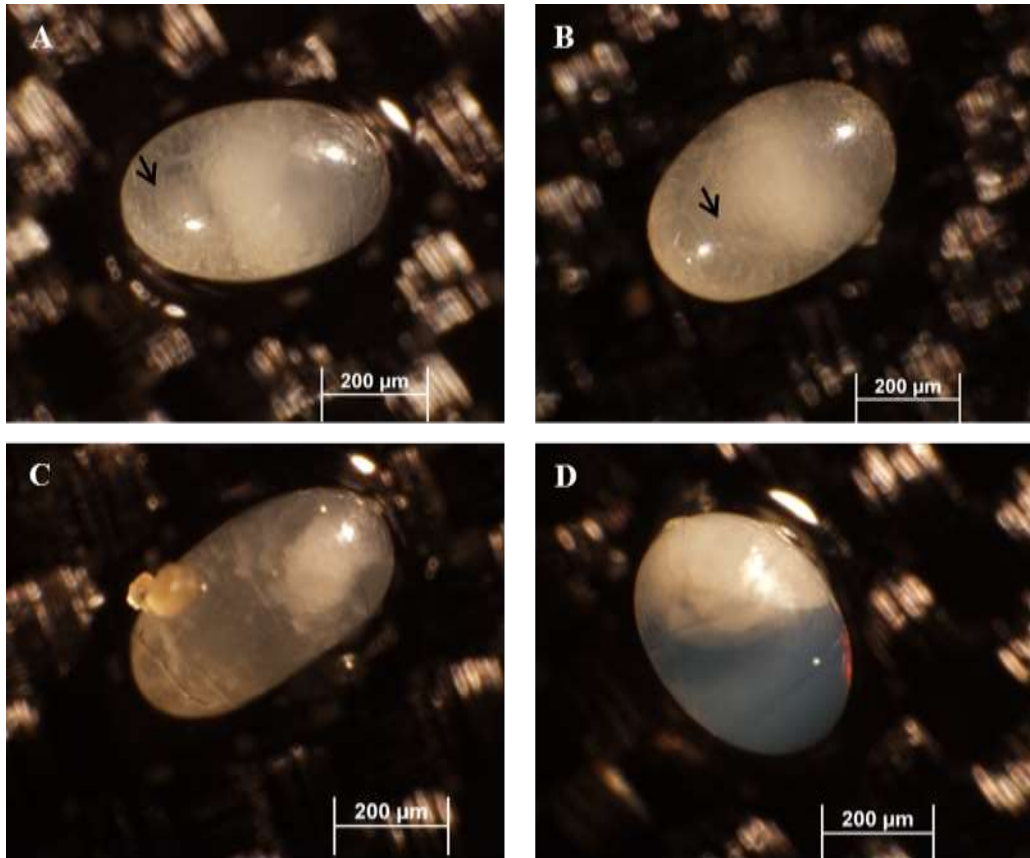


Figura 9. Morfologia externa dos ovos de *Anthonomus grandis* ovipositados por fêmeas oriundas do bioensaio de silenciamento gênico. Os ovos foram coletados 48 horas após oviposição. A – B) Ovos oriundos dos tratamentos controle (500 ng dsGUS e água bi-destilada). Seta indica segmentação do embrião. C – D) Ovos oriundos do tratamento de microinjeção de dsVtg.

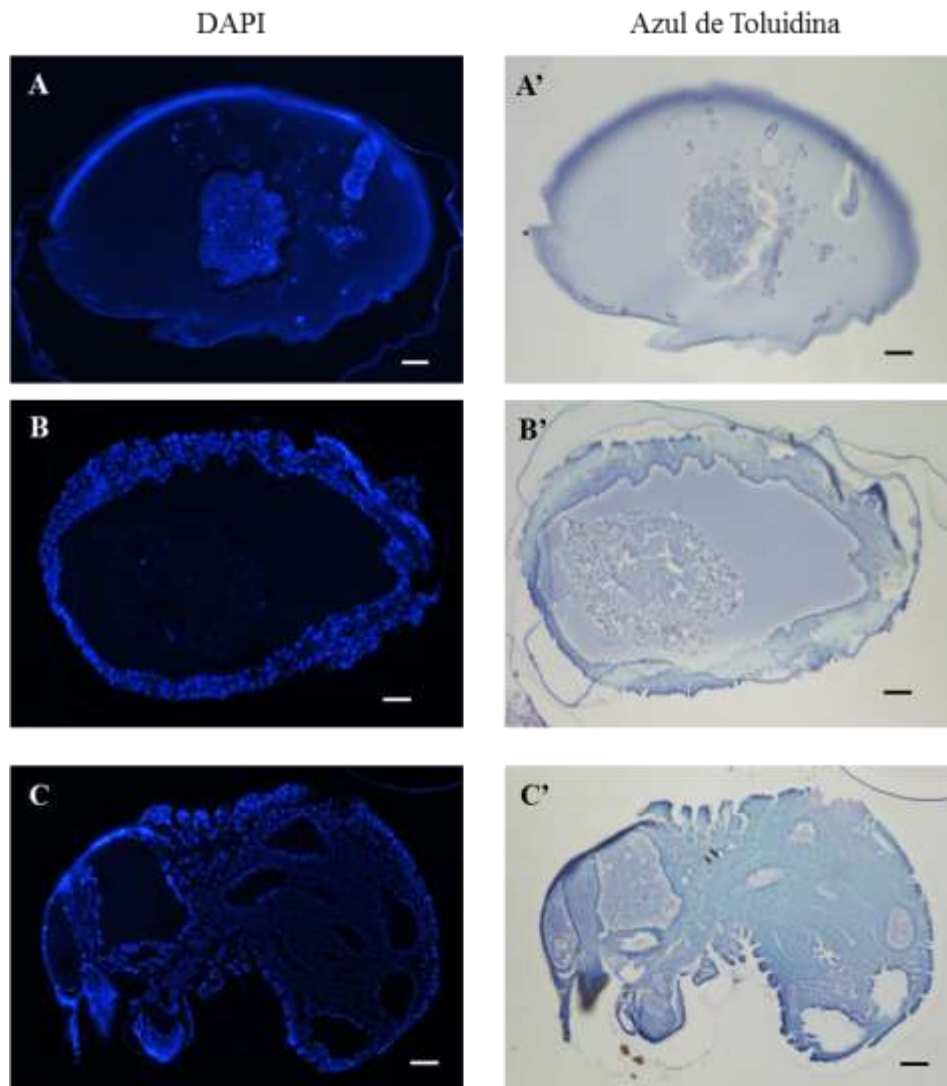


Figura 10. Cortes de ovos de *Anthonomus grandis* ovipositados por fêmeas microinjetadas com dsRNA para Vitelogenina 96 horas após oviposição. A – B') Embriões com desenvolvimento embrionário bloqueado em fase inicial; C – C') Embrião bloqueado em fase mais avançada do desenvolvimento embrionário. A, B, C: Coloração específica de núcleo realizada com DAPI; A', B', C': Coloração geral realizada com azul de toluidina para observações morfológicas. Barra: 50 μ m.

DISCUSSÃO

Sabe-se que a vitelogenina é uma proteína importante para o desenvolvimento embrionário em insetos (Nation, 2008) e vários trabalhos tem relatado esta importância, bem como a regulação da sua síntese em diferentes espécies, inclusive em *A. grandis* (Taub-Montemayor e Rankin, 1997; Taub-Montemayor et al., 2005). Em insetos pertencentes à ordem Coleoptera, a síntese e acúmulo desta proteína são controlados pelo hormônio juvenil, que também está envolvido em outros aspectos da reprodução, como o crescimento dos folículos terminais; estímulo de diferenciação do epitélio folicular; e desenvolvimento de oócitos competentes para a internalização de proteínas (Raikhel e Dhadialla, 1992). No entanto, o presente estudo é o primeiro trabalho que demonstra os resultados biológicos decorrentes da diminuição da expressão da vitelogenina e os fenótipos decorrentes da falta ou diminuição da expressão deste gene na progênie de um inseto.

Através dos experimentos de quantificação relativa dos transcritos do gene da Vitelogenina no desenvolvimento de *A. grandis*, foi verificado que o acúmulo deste transcrito em fêmeas foi maior que em todos os outros estádios, o que se deve ao fato de serem as fêmeas as principais responsáveis pela transferência de vitelo para os oócitos em desenvolvimento (Tufail e Takeda, 2008). Foi também observada uma quantidade relativamente grande de vitelogenina em machos em relação ao ovo (fase utilizada para relativizar a análise). Apesar de não ter sido verificada a proteína em estudos anteriores em machos de *A. grandis* (Taub-Montemayor e Rankin, 1997; Taub-Montemayor et al., 2005), alguns estudos tem verificado que a Vtg não é uma proteína fêmea-específica, tendo sido identificada em quantidades menores em machos de algumas espécies (Engelmann, 1979; Tenczek e Engels, 1986; Valle, 1993; Piulachs et al., 2003). Desta forma, apesar do RNAm de vitelogenina estar sendo transcrito nos machos, pode estar sofrendo modificações pós-transcricionais que impedem a tradução da proteína, impedindo sua detecção nos trabalhos anteriores.

Nas primeiras 96 horas da fase adulta de fêmeas de *A. grandis*, foi observado um aumento gradativo no acúmulo de transcritos de vitelogenina,

atingindo um pico quatro dias após sua emergência, dentro dos tempos avaliados. Isto se deve, provavelmente, ao início da vitelogênese neste inseto, que apresenta um período de pré-oviposição médio de aproximadamente quatro dias (Figura 7 A). Isto é corroborado no trabalho realizado com o mesmo inseto por Taub-Montemayor e Rankin (Taub-Montemayor e Rankin, 1997), que demonstra por imunolocalização *whole mount*, o acúmulo de vitelogenina apenas no oócito terminal, logo antes da oviposição. O mesmo foi observado em *Apis mellifera* (Seehuus et al., 2007) através de imunohistoquímica e *Nilaparvata lugens* (Hemiptera), por *western blot* (Tufail et al., 2010).

O ensaio de imunolocalização da Vitelogenina em *A. grandis*, demonstrou uma forte fluorescência no interior de oócitos terminais, não sendo possível detectar fluorescência em outra parte, como nos corpos gordurosos, por exemplo. Na maioria dos insetos, a vitelogenina e a vitelina são imunologicamente indistinguíveis (Hagedorn e Kunkel, 1979). Sendo assim, o sinal refere-se à vitelina, já que é a forma encontrada no interior dos oócitos, pois após a incorporação nos oócitos, as vitelogeninas são estocadas na forma cristalina, como vitelina, sendo fonte de alimento para o embrião (Tufail e Takeda, 2008). O fato de não ser possível identificar o sinal referente à vitelogenina na hemolinfa pode ser devido à baixa concentração, já que a proteína está diluída.

Após o bioensaio de microinjeção, o silenciamento gênico foi confirmado por qRT-PCR e demonstrou uma diminuição considerável no acúmulo de transcritos deste gene (Figura 6). É importante destacar que o acúmulo de transcritos da vitelogenina em fêmeas 72 horas após microinjeção é semelhante ao acúmulo deste mesmo transcrito em fêmeas mais jovens do tratamento controle (Figura 6), o que significa que houve uma amplificação do silenciamento gênico. Isto é confirmado pelo fato de que, proporcionalmente, o silenciamento gênico da vitelogenina em fêmeas 72 horas após a microinjeção pôde compensar o aumento da transcrição deste gene em fêmeas do tratamento controle de mesma idade de tal forma que a expressão gênica neste *time point* foi semelhante à expressão gênica inicial da fase adulta (Figura 6). O gene homólogo foi silenciado primeiramente através de injeção de

dsRNA em abelhas, no entanto, o silenciamento foi confirmado por *Western blot* e *Northern blot*, não sendo possível quantificar (Amdam et al., 2003). Porém, Antonio et al. (Antonio et al., 2008), conseguiram silenciar o mesmo gene também em abelhas e obtiveram uma expressão relativa em torno de 25 vezes menor que no controle, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho, para *A. grandis*.

O silenciamento de Vtg não resultou no atraso do período de pré-oviposição ou na diminuição da quantidade de ovos ovipositados, no entanto houve uma redução considerável na viabilidade dos ovos. Nenhum dos estudos de silenciamento de genes envolvidos em processos reprodutivos obteve resultado semelhante. No caso do silenciamento de Vtg em *A. mellifera*, só foram avaliados o decréscimo nos níveis de RNAm de Vtg (Amdam et al., 2003) e o estímulo do início precoce do comportamento de forrageamento (Antonio et al., 2008). Em *T. castaneum*, estudos de silenciamento de outros genes envolvidos na reprodução de insetos, como hormônio juvenil acilmetiltransferase (HJAMT), “Methoprene tolerant” (Met) e Kruppel (Kr-h1) resultaram numa redução da produção de ovos em até 90%, e quando o silenciamento foi dos genes para o receptor de ecdisona (EcR) e ultraespiráculo (USP), não houve produção de ovos. Além disso, foram também observadas mudanças morfológicas correspondentes ao atraso na maturação de ovários, ovariolos e oócitos (Parthasarathy et al., 2010). Além destes, há relatos de silenciamento do Receptor de Vitelogenina (RcVtg) em *Spodoptera litura* (Shu et al., 2011) e *Dermacentor variabilis* (Acari) (Mitchell et al., 2007). Em *S. litura* não resultou em mudança significativa, na taxa de oviposição quando o adulto foi microinjetado; no entanto, não foi avaliada a eclosão de larvas, não sendo possível aferir nada a respeito do sucesso reprodutivo deste inseto com RcVtg silenciado. Mas em *D. variabilis*, foi observado que não houve postura e quando foram avaliados os ovários, verificou-se que não houve acúmulo de Vtg. Em relação ao período de pré-oviposição, apenas o trabalho desenvolvido por Ciudad et al. (Ciudad et al., 2007) verificou um atraso de um dia em *Blattella germanica* (Blattodea) quando foi realizado o silenciamento da Lipophorina, uma proteína que envolve o transporte de lipídeos entre diferentes tecidos atuando também durante a vitelogênese.

As avaliações histológicas dos ovos neste trabalho mostraram uma variabilidade de fenótipos que sugerem uma diversidade de resposta ao silenciamento gênico de Vtg (Figuras 9 e 10). Na literatura disponível sobre silenciamento gênico em insetos não existe relatos a respeito de variação de fenótipos encontrados dentro de um único experimento. As variações relatadas na literatura estão relacionadas aos diferentes métodos de entrega do dsRNA (alimentação ou microinjeção), ou à espécie alvo (Terenius et al., 2011). Isto não significa, no entanto, que não é possível haver esta variabilidade, mas deve-se ao fato de os trabalhos até então publicados nesta temática não focarem nos fenótipos decorrentes do silenciamento gênico, mas na confirmação do silenciamento gênico por análise da expressão gênica e dados biológicos.

Há quatro proposições que podem explicar junta ou separadamente a variabilidade de fenótipos encontrada no silenciamento de Vtg no presente trabalho: (1) Como pode ser constatado na figura 7, a eficiência do silenciamento aumentou ao longo do tempo, informação confirmada pela diminuição no acúmulo de transcritos do gene da Vtg ao longo do tempo. Desta forma, os ovos produzidos inicialmente podem ter recebido uma quantidade maior da proteína que os posteriores. Apesar disto não ser suficiente para permitir a eclosão, pode ter proporcionado um desenvolvimento embrionário mais avançado. (2) A eficiência da maquinaria de silenciamento gênico do indivíduo (da fêmea) pode ser diferente por causa de variabilidade genética dentro da espécie. (3) Esta variabilidade pode, também, ter ocorrido em decorrência de erro experimental (no que diz respeito ao momento da microinjeção, se houve ou não extravasamento de hemolinfa, por exemplo). Isto pode ser limitante também na quantidade final de proteína que a fêmea consegue traduzir e acumular nos oócitos, permitindo que os embriões sigam mais adiante no desenvolvimento embrionário. (4) O silenciamento gênico da vitelogenina pode estar interferindo na expressão de outros genes envolvidos no desenvolvimento embrionário. Já que se sabe que o desenvolvimento embrionário é um processo que exige uma grande sincronia na expressão dos genes responsáveis por cada etapa do desenvolvimento (Klowden, 2007), e as diferentes quantidades de Vtg, pelas razões acima destacadas, podem estar

influenciando negativamente nesta sincronia. O processo de produção da vitelogenina é bastante estudado em insetos, no entanto, a importância dela nos processos subsequentes não é bem esclarecida.

Sabe-se, a respeito do processamento de Vtg, que análises em *B. germanica* nos fornecem uma relação funcional entre dimensão do polipeptídeo processado ds Vtg nesta espécie e a presença de atividade de protease na ooteca ovipositada e o avanço do desenvolvimento embrionário. Embriões sem atividade de protease bloqueiam o processamento de Vtg e o desenvolvimento (Nordin et al., 1990). Há uma hipótese a respeito de uma possível significância biológica da proteólise programada da Vtg durante a embriogênese de insetos, que diz que esta proteólise pode liberar ecdisteróides maternos ligados a Vtg, que são metabolizados para produzir uma ativação hormonal de certos eventos embrionários (Lagueux et al., 1984; Bownes et al., 1988).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, vale salientar o potencial do uso deste gene no controle genético de *A. grandis*. Sabe-se que é o inseto adulto que coloniza a cultura do algodão em condições de campo. Sendo assim, pode-se pensar em estratégias de controle, ou por transgenia ou por meio de inseticidas a base de nanomoléculas carreando o dsRNA para este gene, que tenham o adulto como alvo, para que ele se alimente desta molécula e possa, já na primeira geração, ocorrer uma diminuição considerável da progênie e, conseqüentemente, uma diminuição da infestação desta praga na cultura. Além disso, o fato de este inseto apresentar apenas uma cópia deste gene (Trewitt et al., 1992) é muito importante pelo fato de impedir uma compensação pela expressão de outra cópia do gene ou de outro gene. Isto garante, então, que não há nenhuma outra forma deste inseto produzir a vitelogenina quando ocorrer o “*knockdown*” do gene que codifica esta proteína. No entanto, ainda há a necessidade de testes por meio de alimentação para estudar a melhor estratégia a ser utilizada no sentido de controlar esta praga.

Com o objetivo de utilizar a ferramenta de RNAi para controlar coleópteros praga, Baum et al. (Baum et al., 2007), realizaram testes de alimentação de dsRNA em dieta dos coleópteros *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica undecimpunctata howardii*, *Leptinotarsa descemlineata* e *A. grandis*,

e observou que os genes escolhidos proporcionaram letalidade nas três primeiras espécies, mas não em *A. grandis*. No entanto, o próprio autor discute que isto pode ser devido a alguns fatores, como o fato de a larva do inseto entrar na dieta para se alimentar, utilizando uma porção restrita da dieta como alimento. Adicionado a isto, a larva pode possuir nucleases no intestino que são capazes de degradar o dsRNA antes mesmo dele produzir um efeito de silenciamento (Arimatsu et al., 2007; Liu et al., 2012).

No entanto, nenhum destes argumentos é definitivo de maneira que desestimule a busca por ferramentas que possam ser utilizadas em conjunto com o dsRNA para o controle de *A. grandis*, visto que esta é uma temática que ainda está começando a ser abordada para o uso no controle de insetos pragas e ainda há muito a ser estudado a este respeito.

2.5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra que transcritos para a Vitelogenina, em *A. grandis*, estão presentes tanto na fêmea como no macho e o acúmulo desta proteína concentra-se especialmente nos oócitos. Sua função, na fêmea, está diretamente relacionada ao seu sucesso reprodutivo, tendo em vista que quando o gene é silenciado, as fêmeas tornam-se inférteis, podendo colocar ovos, sendo, no entanto, inviáveis. Também é importante ressaltar a diversidade de fenótipos identificados nos ovos advindos de fêmeas submetidas ao silenciamento, que sugerem que o silenciamento pode apresentar diferenças entre os indivíduos ou pode estar interferindo na regulação de outros genes envolvidos no desenvolvimento embrionário.

2.6. REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Guidugli, K.R., Norberg, K., and Omholt, S.W. 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by

- intraabdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* 3:1-8.
- Antonio, D.S.M., Guidugli-Lazzarini, K.R., do Nascimento, A.M., Simoes, Z.L.P., and Hartfelder, K. 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 95:953-961.
- Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y., and Furusawa, T. 2007. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:176-183.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., and Roberts, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25:1322-1326.
- Bownes, M., Shirras, A., Blair, M., Collins, J., and Coulson, A. 1988. Evidence that insect embryogenesis is regulated by ecdysteroids released from yolk proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85:1554–1557.
- Ciudad, L., Belles, X., and Piulachs, M.D. 2007. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. *Bmc Molecular Biology* 8.
- Engelmann, F. 1979. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Advances in insect physiology*. 14:49-108.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti-Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.L., and Omoto, C. 2002. *Entomologia Agrícola*. FEALQ, Piracicaba.
- Hagedorn, H.H., and Kunkel, J.G. 1979. Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annual Review of Entomology* 24:475-505.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. 2002. RNAi: nature abhors a double-strand. *Current opinion in genetics & development* 12:225-232.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. 1998. Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. *Cell* 95:1017-1026.
- Klowden, M.J. 2007. *Physiological Systems in Insects*. Elsevier, London.
- Lagueux, M., Hoffmann, J.A., Goltzené, F., Kappler, C., Tsoupras, G., Hetru, C., and Luu, B. 1984. Ecdysteroids in Ovaries and Embryos of *Locusta migratoria*. Pages 168-180 in: *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*> N. S. Iacobellis, Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo J., Schaad, N. W., Stead, D.E., Surico, G., and Ullrich, M, eds. Kluwer Academic Springer Berlin Heidelberg, Dordrecht, The Netherlands.

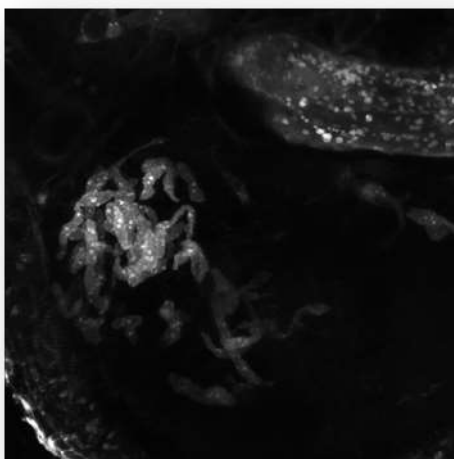
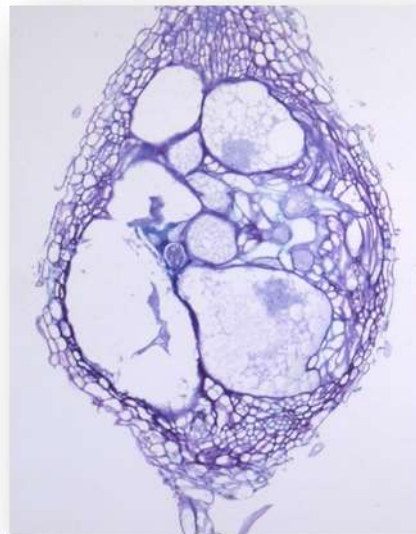
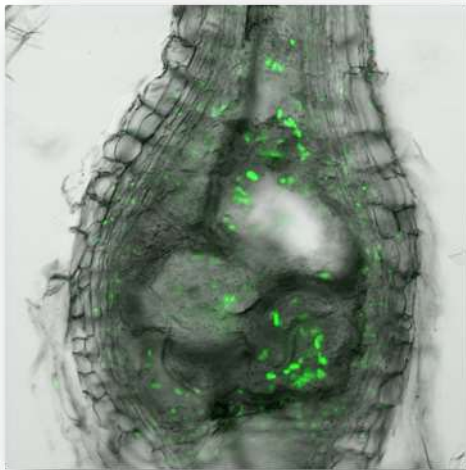
- Liu, J., Swevers, L., Iatrou, K., Huvenne, H., and Smagghe, G. 2012. Bombyx mori DNA/RNA non-specific nuclease: Expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. *Journal of Insect Physiology* 58:1166-1176.
- Mitchell, R.D., 3rd, Ross, E., Osgood, C., Sonenshine, D.E., Donohue, K.V., Khalil, S.M., Thompson, D.M., and Michael Roe, R. 2007. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:375-388.
- Nation, J.L. 2008. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, New York.
- Nordin, J.H., Beaudoin, E.L., and Liu, X. 1990. Proteolytic processing of *Blattella germanica* vitellin during early embryo development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 15:119-135.
- Parthasarathy, R., Sheng, Z., Sun, Z., and Palli, S.R. 2010. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40:429-439.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.
- Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P., and Bellés, X. 2003. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:459-465.
- Raikhel, A.S., and Dhadialla, T.S. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology* 37:217-251.
- Sappington, T.W., and Raikhel, A.S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28:277-300.
- Sappington, T.W., and Spurgeon, D.W. 2000. Preferred Technique for Adult Sex Determination of the Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93:610-615.
- Seehuus, S.C., Norberg, K., Krekling, T., Fondrk, K., and Amdam, G.V. 2007. Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* 7:1-14.
- Sheng, Z., Xu, J., Bai, H., Zhu, F., and Palli, S.R. 2011. Juvenile Hormone Regulates Vitellogenin Gene Expression through Insulin-like Peptide Signaling Pathway in the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*. *The Journal of Biological Chemistry* 286:13.
- Shu, Y.H., Wang, J.W., Lu, K., Zhou, J.L., Zhou, Q., and Zhang, G.R. 2011. The first vitellogenin receptor from a Lepidopteran insect: molecular characterization, expression patterns and RNA interference analysis. *Insect Molecular Biology* 20:61-73.
- Snigirevskaya, E.S., Hays, A.R., and Raikhel, A.S. 1997. Secretary and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell and tissue research* 290:129-142.
- Taub-Montemayor, T.E., and Rankin, M.A. 1997. Regulation of vitellogenin synthesis and uptake in the boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Physiological Entomology* 22:261-268.

- Taub-Montemayor, T.E., Min, K.J., Chen, Z., Bartlett, T., and Rankin, M.A. 2005. JH III production, titers and degradation in relation to reproduction in male and female *Anthonomus grandis*. *Journal of Insect Physiology* 51:427-434.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C.J., Aymeric, J.L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalieri, F., Collinge, D.P., Crava, C.M., de Maagd, R.A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felfoldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A.S., Gatehouse, H.S., Gatehouse, L.N., Giebultowicz, J.M., Gomez, I., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Groot, A.T., Hauser, F., Heckel, D.G., Hegedus, D.D., Hrycaj, S., Huang, L.H., Hull, J.J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M.R., Kotwica, J., Li, C.Y., Li, J.H., Liu, J.S., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P.J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam, M.V., Saenko, S., Simpson, R.M., Soberon, M., Strand, M.R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C.W., Whyard, S., Zhang, W.Q., Nagaraju, J., Ffrench-Constant, R.H., Herrero, S., Gordon, K., Swelters, L., and Smagghe, G. 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology* 57:231-245.
- Trenczek, T.A., and Engels, W. 1986. Occurring of vitellogenin in drone honeybees. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 10.
- Trewitt, P.M., Heilmann, L.J., Degrugillier, S.S., and Kumaran, A.K. 1992. The Boll Weevil Vitellogenin Gene: Nucleotide Sequence, Structure, and Evolutionary Relationship to Nematode and Vertebrate Vitellogenin Genes. *Journal of Molecular Evolution* 34:478-492.
- Triplehorn, C.A., and Johnson, N.F. 2011. *Estudos dos Insetos*. Cengage Learning, São Paulo.
- Tufail, M., and Takeda, M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology* 54:1447-1458.
- Tufail, M., Naeemullah, M., Elmogy, M., Sharma, P.N., Takeda, M., and Nakamura, C. 2010. Molecular cloning, transcriptional regulation, and differential expression profiling of vitellogenin in two wing-morphs of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology* 19:787-798.
- Valle, D. 1993. Vitellogenesis in insects and other groups: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88:1-26.
- Vieira, P., Banora, M.Y., Castagnone-Sereno, P., Rosso, M.N., Engler, G., and de Almeida Engler, J. 2012. An immunocytochemical procedure for protein localization in various nematode life stages combined with plant tissues using methylacrylate-embedded specimens. *Phytopathology* 102:990-996.
- Zhao, S., and Fernald, R.D. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology* 12:1047-1064.

CAPÍTULO 3

ON THE TRACK OF UNRAVELING THE FUNCTION OF *KRP* CELL CYCLE INHIBITORS DURING ROOT-KNOT NEMATODE FEEDING SITE DEVELOPMENT.

(Trabalho apresentado em formato de submissão para a revista *Molecular Plant-Microbe Interactions*)



INTRODUÇÃO

Nematoides do gênero *Meloidogyne* são patógenos economicamente importantes de uma grande variedade de plantas cultivadas. Estes vermes são altamente adaptados ao parasitismo e são capazes de formar galhas nas raízes das plantas infectadas. Estas galhas são o sítio de alimentação do nematoide, que são compostas por células-gigantes e células vizinhas. Após o estabelecimento do sítio de alimentação, há uma intensa atividade mitótica sem citocinese em células parenquimáticas do tecido vascular da raiz da planta hospedeira, dando origem às células-gigantes multinucleadas que o nematoide utiliza para se alimentar.

Estes organismos são capazes de alterar localmente a expressão gênica de forma controlada, levando à rediferenciação do tecido parasitado (Gheysen e Fenoll, 2002). Dentro deste processo, ocorre a indução de genes do ciclo celular, como quinases dependentes de ciclina (CDKs), e diferentes ciclinas (CYCs) (de Almeida Engler et al., 1999; de Almeida Engler e Gheysen, 2013) assim como genes envolvidos na endoreduplicação (de Almeida Engler et al., 2012).

Genomas de diversas plantas codificam pelo menos duas famílias de inibidores de quinases dependentes de ciclina (CKIs): as ICK/KRPs (inibidores de CDK) e SIM/SMR (SIAMESE). A interação entre KRPs e complexos CDK/CYCs diminuem a atividade de CDK e afetam tanto a progressão do ciclo celular como o conteúdo de DNA. Foram caracterizados em *Arabidopsis* sete membros da família ICK/KRP (mencionados aqui como KRP, *Kip Related Proteins*), que apresentam diferentes padrões de expressão e possivelmente funções distintas.

Recentemente, Vieira et al. (2012; 2013) demonstraram que alguns membros desta família de inibidores do ciclo celular (KRP2, KRP4, KRP5 e KRP6) são expressos em galhas. Análises funcionais revelaram que o aumento dos níveis

endógenos de três KRPs (KRP1, KRP2 e KRP4) levaram a um desarranjo dos eventos de ciclo celular em galhas, afetando drasticamente o tamanho das galhas e consequentemente bloqueando o ciclo de vida do nematoide e sua reprodução. Já a expressão ectópica do gene *KRP6* resultou não na supressão da mitose, mas na sua ativação, demonstrando funções distintas entre diferentes KRPs. Entretanto, até o momento não foi ainda investigada a função de KRPs como, KRP3, KRP5 e KRP7, quanto a sua influencia durante o desenvolvimento do sítio de alimentação de nematoides.

Desta forma durante o estágio de doutorado que realizei no “Institute National de la Recherche Agronomique” em Sophia Antipolis, França, tive a oportunidade de concentrar parte do meu tempo na análise funcional desses três genes inibidores do ciclo celular, ou seja, *KRP3*, *KRP5* e *KRP7*, de *Arabidopsis thaliana* infectada por nematoides (aqui *Meloidogyne incognita*) ainda não investigados. Durante esse projeto participei na realização de análises morfológicas das galhas e raízes não infectadas, testes de resistência, análises dos níveis de ploidia por citometria de fluxo, e localização *in vivo* de KRP proteínas fusionadas a GFP de linhas superexpressando os três genes KRPs. Algumas análises também foram efetuadas em linhas mutantes.

Esse trabalho nos permitiu demonstrar a possível função de KRP3, KRP5 e KRP7 em galhas induzidas por nematoides. Nossos resultados demonstram que todos os membros desta família afetam a progressão do ciclo celular durante a formação de galhas de forma diferente. Esses resultados são, por conseguinte, discutidos nesse capítulo da tese.

On the track of unraveling the function of *KRP* cell cycle inhibitors during root-knot nematode feeding site development.

Roberta Ramos Coelho^{1,2*}, Paulo Vieira^{2,3*}, José Dijair Antonino de Souza Júnior^{1,2}, Natalia Rodiuc^{1,2}, Lieven De Veylder^{4,5}, Maria Fatima Grossi de Sá¹, Gilbert Engler² and Janice de Almeida Engler²†

¹Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte, Caixa Postal 02372 – CEP 70770-917, Brasília, DF – Brazil

²Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1355 ISA/Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7254 ISA/Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR ISA, 400 route des Chappes, Sophia-Antipolis, France

³NemaLab/ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal

⁴Department of Plant Systems Biology, VIB, B-9052 Gent, Belgium

⁵Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, B-9052 Gent, Belgium

*Authors contributed equally to the work.

†Corresponding author: E-mail: janice.almeida-engler@sophia.inra.fr

Summary

Cell cycle control in galls provoked by root-knot nematodes involves the activity of inhibitor genes like the *Arabidopsis* ICK/KRP members. Giant-feeding cell expansion engages an acytokinetic mitotic phase followed by nuclei enlargement most likely caused by endoreduplication. Cells neighboring feeding cells divide asymmetrically giving the knot shape on the host root. Ectopic expression of genes like *KRP1*, *KRP2* and *KRP4* result in drastic decrease in the root-knot or gall size by inhibiting mitotic activity, whereas *KRP6* induce mitosis in galls. Herein, we investigate the role of the three remaining *KRP* genes, named *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* in gall development. Loss-of-function of *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* genes suggested stimulation of the mitotic state illustrated by the presence of cell wall stubs in giant cells. Overexpression of *KRP3* revealed peculiarly elongated giant cells containing clustered and elongated nuclei seemingly connected. Feeding cells were as well smaller compared to wild-type and ectopic *KRP3* expression resulted in disturbed nematode development, consequently affecting nematode reproduction. The consequent decreased mitotic activity in galls resulted in diminished neighboring cell division contributing to the severe decrease in root-knot or gall size. This work strongly supports the idea that induced expression of cell cycle inhibitors such as *KRP3* can be envisaged for nematode feeding site control in crop species attacked by phytopathogenic nematodes.

Key words: root-knot nematodes, *Arabidopsis*, giant cells, cell cycle inhibitors

Introduction

Root-knot nematodes (RKN) are members of the genus *Meloidogyne* (Göldi 1892). They are an economically important group of nematodes, highly adapted for plant

parasitism, and capable of inducing feeding sites within the host vascular tissue (Moens et al. 2009). The nematode feeding site (NFS) induced by RKN is formed by very sophisticated giant cells (GCs), surrounded by proliferative neighboring cells (NCs) (Huang 1985; Sijmons et al. 1994). Giant-feeding cells are induced by secretions of RKN (such as *Meloidogyne incognita*) that are considered the main factors for a successful parasitism (Neveu et al. 2003; Davis et al. 2004). Following the induction of nematode feeding cells by RKN, synchronous waves of mitotic activity uncoupled from cytokinesis drives the formation of multinucleated giant-feeding cells. As GCs develop their nuclei undergo multiple rounds of DNA synthesis coupled to the increased cell size. The cell wall of these specialized feeding cells display highly invaginated areas, resulting in the increased surface exchange with NCs and the xylem, allowing fast nutrient uptake (Huang 1985; Hoth et al. 2008). The final gall shape (root-knot) is the result of the hyperplasia of neighboring cells and the hypertrophy of GCs enfolding the nematode body (Jones and Northcote 1972).

Root-knot nematodes are capable to locally alter plant gene expression in a controlled way, leading to redifferentiation of the parasitized host tissue. Cell cycle genes are induced early during parasitism and it seems to play essential roles in the process for the formation of both gall cell types: GCs and NCs (de Almeida Engler et al. 1999, 2011; Gheysen and Fenoll 2002). The progression of the cell cycle in plants is driven by the periodic activation of cyclin-dependent kinases (CDKs), which in combination with different cyclins (CYCs), trigger the transition of the different phases of the cell cycle (from G1 to S phase and from G2 to M phase) (Inzé and De Veylder 2006). The involvement of the plant host cell cycle machinery in NFS ontogeny have been demonstrated by the differential regulation of a number of core cell cycle genes

of *Arabidopsis* in the gall tissue (such as CDKA;1, CDKB1;1, CYCB1;1 and CYCA2;1) induced by RKN (Niebel et al. 1996; de Almeida Engler et al. 1999; 2012). Plant genomes encode two plant-specific families of cyclin kinase inhibitors (CKIs): the ICK/KRPs (interactors/inhibitors of CDK, or also referred as Kip-Related Proteins) and SIM/SMR (SIAMESE) families. Interactions of KRPs with CDK/CYCs complexes decrease CDK activity, and affect both cell cycle progression and DNA content, in a concentration-dependent manner. In *Arabidopsis thaliana* seven ICK/KRP members (hereafter mention as KRP), have been characterized which show distinct spatial and temporal expression patterns and exert distinctive functions (De Veylder et al. 2001; Menges and Murray 2002; Ormenese et al. 2004; Menges et al. 2005; Wang et al. 2006). The two cell cycle types, mitosis and endocycle, share common components and cell cycle phases (at least G1 and S) prompting DNA replication. Differences engage mitosis (G2 and M phases) involved on cell division, whereas endoreduplication implies increased nuclear ploidy levels. It is therefore tempting to target both pathways to modulate progression of the cell cycle in giant cells induced by these highly specialized plant-parasitic nematodes. Recently, Vieira et al. (2012; 2013) showed that some members of this family of cell cycle inhibitors (KRP2, KRP4, KRP5 and KRP6) are expressed in galls. Functional analysis revealed that the increased endogenous levels of KRP1, KRP2 and KRP4 led to a disarray of cell cycles events in galls, consequently blocking the ordinary of RKN life cycle (Vieira et al. 2012; 2013). However, the roles of KRP3, KRP5 and KRP7 during NFS development remain to be investigated. Ongoing studies on KRP6 suggest that this protein might differently affect the plant cell cycle and gall growth (Vieira et al., unpublished data).

Therefore, we performed functional analyses of the remaining *Arabidopsis KRP* family members (*KRP3*, *KRP5* and *KRP7*) of cell cycle inhibitors to find out their effect on gall development. Results present herein demonstrate that all members of the *KRP* gene family can disarray the cell cycle in NFS with severe effect on gall size and subsequent RKN reproduction.

Material and Methods

Plant growth and transformations

For construction of the *KRP**pro*:*GUS* (*KRP3*, *KRP5* and *KRP7*) lines, the intergenic regions (up to maximum 2 kb) were amplified from *Arabidopsis* genomic DNA. The corresponding PCR fragments were cloned into the pDONR207 entry vector by BP recombination cloning and subsequently transferred into the pKGWFS7 destination vector (Karimi et al. 2002) by LR cloning, resulting in a transcriptional fusion between the *KRP* promoters and the *EGFP-GUS* fusion gene. The loss-of-function *krp3* (GK-185C07 and 186607 – TB24), *krp5* (Salk-053533) and *krp7* (GK-841D12 and GK-901F05) mutants were obtained from the *Arabidopsis* Biological Resource Center. Homozygous knockout mutant lines were tested by PCR with specific primers using genomic DNA (Table S1). Kanamycin resistant T3 overexpressing lines (*35S:KRP3-GFP*, *35S:GFP-KRP5* and *35S:KRP7-GFP*, hereafter referred to as *KRP3^{OE}*, *KRP5^{OE}* and *KRP7^{OE}*, respectively) were bulked and selected from T0 lines kindly provided by Lieven De Veylder. *Arabidopsis thaliana* genotype Columbia 0 (Col-0) was used as the wild-type control. Both transgenic and wild-type *A. thaliana* Col-0 seeds were surface sterilized for 10 min in 5% NaOCl, washed four times with 95% ethanol and dried under the hood overnight. Seeds were germinated and grown in a growth chamber with a 16-h light/8-h dark photoperiod at 21°C/18°C, respectively.

GUS histochemical analysis and microscopy

Promoter activity of *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* genes was monitored at 7, 14, and 21 days after inoculation (DAI), as described by de Almeida Engler et al. (1999), using 200 *Meloidogyne incognita* freshly hatched second-stage juveniles. Whole galls were fixed and infiltrated with chlorallactophenol-clearing solution (Beeckman and Engler, 1994) for examination with DIC (Differential Interference Contrast) optics. For dark-field microscopy, gall samples were fixed in 2.0% glutaraldehyde overnight, embedded in Technovit 7100 and thin sectioned using standard microtomy as described by de Almeida Engler et al. 1999.

RT-PCR analyses of transgenic versus wild-type lines

To confirm the respective absence of transcripts in each individual *KRP* mutant line, or the *KRP* levels in each overexpression line semi-quantitative RT-PCR was performed. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Molecular Research Center) from 7-day-old whole seedlings. Plants overexpressing each *KRP* gene (*KRP3^{OE}*, *KRP5^{OE}* and *KRP7^{OE}*) were previously selected based on their phenotype and protein localization. Knockout lines *krp3* (GK-185C07 and 186607 – TB24), *krp5* (Salk-053533) and *krp7* (GK-841D12 and GK-901F05) were selected by RT-PCR. All pairs of primers pairs are specified in table S1.

Morphological analysis of gall tissues

A. thaliana wild-type Col-0 seeds and transgenic lines were germinated as described by de Almeida Engler et al. (1999). Seeds were placed into sterile Petri dishes on 1% Murashige and Skoog germination medium containing 1% sucrose and 0.8% plant

cell culture–tested agar, supplemented with the proper antibiotics. Seedlings were grown vertically on a 16h light/8h darkness photoperiod at 21°C/18°C, respectively. Three-week old seedlings of both knockout and overexpressing lines were transferred to soil (3:1 of sand to humus), and 10 days later infected with 400 freshly hatched *M. incognita* second-stage juveniles. Infected roots were harvested at 7, 14, 21 and 40 DAI and fixed in 2% glutaraldehyde in 50 mM PIPES buffer, pH 6.9, and subsequently dehydrated and embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) as depicted by the manufacturer. Nematode induced-galls were sectioned (3 µm) and stained in 0.05% toluidine blue and mounted in Depex (Sigma-Aldrich). Microscopic analyses were carried out using bright-field optics and images were acquired with a digital camera (Axiocam, Zeiss).

Surface dimensions of giant cells in the KRP3^{OE} line

Up to three of the largest GCs per gall section were selected and analyzed at different time points after nematode infection (7, 14 and 21 DAI for knockout lines and 7, 14, 21 and 40 DAI for overexpressing lines) and the surface was measured using the Axioplan software. A minimum of 30 GCs was measured, from root sections from each time point studied. Effect of mutation and the time point were analyzed with Analysis of Variance (ANOVA). All computation was performed with SPSS (version 10, Chicago, IL).

Flow cytometry analyses of infected and gall less roots

Plant roots were chopped up with a razor blade in 400 µl of 45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid pH 7 and 0.1% Triton X-100 (Galbraith et al. 1991). The supernatant was filtered throughout a 30µm mesh,

and 1 µg/ml of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in distilled water was added. The nuclei were examined with the LSRII Fortessa (BD Biosciences) flow cytometer and the BD FACSDiva software (BD Biosciences). For uninfected and gall-less roots data were assembled from approximately 2000 nuclei per run. Three independent biological repetitions were carried out using roots of six plants for each line and each experiment. Ploidy levels of 30 galls (30 DAI) were pooled for each independent test. Two replicates and two biological repetitions were carried out for each line, and data of approximately 40.000 nuclei per run were collected. The mean values of repetitions of the independent experiments were calculated, and the portion of nuclei with ploidy levels from 2C to 128C was expressed as the % of the total number of nuclei recorded.

KRP protein localization during cell division and nematode feeding site development

Whole non-infected 7-day-old roots of *KRP3^{OE}*, *KRP5^{OE}* and *KRP7^{OE}* lines were examined using an inverted confocal microscope (ZEISS LSM 510 META) for KRP protein localization during cell division. The *KRP3^{OE}* line was then inoculated with *M. incognita* as described above and galls at 20 DAI were dissected from roots and embedded in 5% agar. Fresh thick sections of 100-200 µm were made with a HM650V Vibratome Microm (Walldorf, Germany). Fresh gall slices were analyzed using confocal microscopy and specificity of GFP fluorescence was confirmed by spectral imaging using 488-nm laser line excitation and emission spectrum acquisition ranging from 499 to 550-nm. Alternatively, GFP emission fluorescence was captured in standard scanning mode with a 500-530 nm band pass emission filter. All observations were performed from at least three independent experiments.

Nematode infection tests and acid fuchsin staining

Three-week old *A. thaliana* Col-0 and transgenic seedlings germinated *in vitro* were transferred to soil and 10 days later infected with 200 freshly hatched *M. incognita* second-stage juveniles. Thirty days after inoculation, the number of galls and egg masses were counted from each plant and compared with control plants. Infection tests for each transgenic line in two independent biological repetitions were performed. To identify the nematode life cycle stage, the same infected roots were fixed and stained for 5 h in a solution of equal parts of 95% ethanol and glacial acetic acid, containing 17.5 mg/L acid fuchsin. Root tissues were cleared by soaking in a solution of chloral hydrate (0.2 g/mL of H₂O) for 16 h. After washing several times with tap water, roots containing nematodes were stored in acidified glycerol (five drops of 1.0 M HCl in 50 mL of glycerol).

Whole-mount analysis of propidium iodide stained and cleared infected roots

Nuclear analysis of cleared galls was carried out based on the protocol described by Vieira et al. (2012), for uninfected roots and nematode infected roots (20 DAI). Propidium Iodide (PI) stained samples were mounted with 90% glycerol on a microscope slide. Cleared infected roots were analyzed with a Zeiss LSM 510 META confocal microscope. Dye excitation was carried out with the 543 nm line of a HeNe laser. Stacks were produced from nearly 50 images of 1 µm optical slice thickness and used to generate maximum brightness projections.

Results

GUS promoter activity of *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* genes in galls

Promoter activity of *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* was monitored at different gall developmental stages (3, 7, 14 and 21 DAI). GUS staining on sectioned galls illustrated high promoter activity of *KRP5* gene during migration within the roots and early after nematode infection even during short incubations (1 h) (Fig. 1, 3-7 DAI and S1, 7 DAI). Decreased promoter activity was confirmed in GC once gall matured (Fig. 1 and Fig. S1, 21 DAI) as described by Vieira et al. (2013). In contrast, longer incubation times (than done by Vieira et al. 2013) of *KRP3pro:GUS* and *KRP7pro:GUS* lines confirmed no promoter activity at comparable time points during gall development (Fig. 1 and Fig. S1, 7-21 DAI). Sectioned galls confirmed the absence or very weak GUS activity in NCs of *KRP3pro:GUS* and *KRP7pro:GUS* lines (Fig. 1 and Fig. S1).

Nematode life cycle was analyzed during infection tests (Fig. S3).

Loss of *KRP* function induces mitosis in galls affecting nematode reproduction

Single insertion mutant lines of *krp3*, *krp5* and *krp7* were obtained from public collections and a detailed morphological analysis was performed during NFS development (7, 14 and 21 DAI). Morphology of galls induced in mutant lines was seemingly alike to the wild-type, although more proliferation of neighboring cells was observed in *krp3* line compared to wild-type (Fig. S2). In addition, cell wall stubs within GCs were seen in *krp3* and *krp7* GCs suggesting stimulation of incomplete cytokinetic events. To examine if the knockout of a non-expressed (*krp3*) and an expressed (*krp5*) *KRP* gene in galls had any effect on nematode development and reproducibility, infection tests were performed. Curiously, among the two genes, *krp3* mutant showed a significant reduction gall in number (60% less galls than wild-type), followed by a significant reduction of the number of egg masses for both *krp3* and

kpr5 (approx. 45% less egg masses than wild-type) (Fig. S3). Fuchsin stain in both lines revealed a delay in nematode development and less matured into fertile females compared to egg laying females associated with wild-type galls (Fig. S3).

Overexpression of *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* differentially affects gall development

Overexpressing lines of the *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* genes (*35S:KRP3-GFP*, *35S:GFP-KRP5* and *35S:KRP7-GFP*) have been generated and analyzed during gall development. Lines selected for RKN infection were based on three criteria: presence of the typical serrated leaf phenotype (Fig. S4A), increased expression levels of each *KRP* gene (Fig. S4C), and nuclear localization (Fig. S4B). *KRP3^{OE}* and *KRP7^{OE}* lines presented higher expression levels than the *KRP5^{OE}* line (Fig. S4C). Therefore, weaker phenotype and upregulation of transcripts was observed for the last. The three *KRP* overexpressing lines also presented an undersized root apical meristem compared to the wild-type line (Fig. S4D).

A detailed microscopic analysis of feeding sites induced in *KRP3^{OE}* and *KRP7^{OE}* roots illustrated a severe reduction of gall size at different developmental stages (7, 14, 21 and 40 DAI) mainly due to the reduced number of cells neighboring the GCs. Galls induced in the *KRP3^{OE}* line presented GCs with a narrowed elongated phenotype compared to a more rounded shape observed for wild-type (Fig. 2). Giant cells in the *KRP7^{OE}* line were apparently smaller and cells neighboring giant cells were disordered compared to a wild-type gall (Fig. 2). Surface measurements of *KRP3^{OE}* GCs were carried out on a minimum of 30 GCs at 7, 14, 21 and 40 DAI, and compared to the size of wild-type GCs (Fig. 3). Average surface of GCs in *KRP3^{OE}*

was smaller than WT. Larger variability in giant GC size was observed for the *KRP5^{OE}* and *KRP7^{OE}* lines, therefore no statistical analysis is presented.

Ectopic *KRP3* expression induces changes in nuclei shape and ploidy levels in giant cells

A number of nuclei in GCs within *KRP3^{OE}* infected roots presented an elongated phenotype and appeared to be connected (Fig. 4A) forming an abnormal nuclear phenotype compared wild type GCs (Fig. 4B). Due to the convoluted shape of nuclei it was not possible to record numbers. Ploidy levels of uninfected roots, gall-less infected roots and galls of *KRP3^{OE}* were recorded and compared to wild-type. Nuclear flow cytometry measurements revealed that the ploidy levels of uninfected roots and gall-less infected roots of wild-type and mutant lines ranged from 2C to 16C (Fig. 4C). Ploidy levels of nuclei in *KRP3^{OE}* galls, compared to wild-type, were measured on a pool of 30 mature galls (per sample) per line at 30 DAI. Ploidy populations from wild-type galls varied from 2C to 128C (Fig. 4D). In the *KRP3^{OE}* line more nuclei showed 2C DNA content, probably relating to the increased number of neighboring cells, which make up the bulk of a gall. The slightly increased ratio of nuclei over 16C in *KRP3^{OE}* galls, compared to gall-less roots indicates that higher ploidy levels probably come from nuclei originated from nematode-induced GCs (Fig. 4D).

***KRP3* and *KRP5* co-localize with chromosomes during mitosis, while *KRP7* seems to be degraded during mitosis**

All KRPs show a nuclear localization during interphase with *KRP3* and *KRP5* displaying a sub-nuclear localization (Fig. S4B). For both genes showing a sub-nuclear localization, the fluorescence signal was associated with the chromosomes

during all phases of mitosis (Fig. 5). In the case of KRP7-GFP, proteins seem to disperse into the cytoplasm after nuclear envelope breakdown during mitosis. Once the formation of the two daughter cells occurs, we could observe a progressive accumulation of KRP7-GFP protein within the nuclei of the two daughter cells (Fig. 5).

To follow protein patterns along NFS development the same KRP3-GFP line was used (Fig. 6). When KRP3-GFP was ectopically expressed in GCs, a strong fluorescence was associated with the GCs and NCs nuclei in mature giant cells (Fig. 6). The 3D-confocal projections confirmed the inter-connectivity of the GCs nuclei in comparison to the individually separated GCs nuclei of the wild-type line seen in whole mount projections (Fig. 4B).

Ectopic expression of *KRP* impairs nematode maturation and reduces offspring

We also examined whether the morphological changes derived by the ectopic expression of the *KRP3* gene (Fig. 2) would have any effect on nematode life cycle. In *KRP3^{OE}* line, infective J2 nematodes were able to penetrate and migrate along the roots, and induce galls. However, at 30 DAI, a 40% and 80% reduction in gall number and number of egg masses, respectively was observed (Fig. 7A) compared with wild-type. Infected roots (30 DAI) were stained with acid fuchsin to identify the developmental stage of nematodes (Fig. 7B). Whereas in wild-type plants, most of the pear-shaped females achieved the reproductive maturity at late stages of nematode infection (30 DAI), in *KRP3* overexpressing lines, most nematodes remained as parasitic juveniles (J2) and were associated with small feeding sites within plant roots (Fig. 7B).

Discussion

Successful parasitism of obligatory sedentary plant-pathogens such as the RKN is dependent on the cell cycle machinery of the plant host (de Almeida et al., 2011). Here we investigate the function of three plant cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors, *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* of the *Arabidopsis* ICK/KRP family on nematode feeding site development. We have shown before that ectopic expression of *KRP1*, *KRP2* and *KRP4* severely reduced gall expansion. (Vieira et al. 2012; Vieira et al. 2013). This drastic effect on gall size is the result of the decreased giant cell size and the acute inhibition of cell division in neighboring cells. On the other hand, ectopic *KRP6* expression resulted in larger galls embedding giant cells of reduced size but with accelerated proliferation of neighboring cells compared to a wild-type gall (Vieira et al., submitted). These data indicate that different members of the *Arabidopsis* ICK/KRP family can exert different functions during gall development. Therefore, ***ICK6/KRP3*, *ICK3/KRP5* and *ICK5/KRP7*** (hereafter referred to as *KRP3*, *KRP5* and *KRP7*) genes were analyzed herein. Since the *KRP3*^{OE} line gave clear morphological changes in giant cells and their nuclei, as well as a reduced gall sizes, we focused our functional studies primarily on the *KRP3* gene.

***KRP3*, *KRP5* and *KRP7* are differently expressed in galls**

Previous promoter-GUS fusions and mRNA *in situ* hybridization have shown that *KRP5* is expressed in galls, while transcripts of *KRP3* and *KRP7* were not detected (Vieira et al., 2013). Here, we show that the *KRP5* promoter is already activated during nematode penetration at the root elongation zone, migration intercellularly in the root vascular tissue and during giant cell induction. Analysis of similar time points

of both *KRP3pro:GUS* and *KRP7pro:GUS* lines showed absence of any promoter activity in galls. Upon prolonged GUS assays (ON) a punctual expression of a small number of cells of *KRP3* and *KRP7* in galls but mainly in neighboring cells could be observed. These data confirm that nematodes do not induce *KRP3* or *KRP7* any significant promoter activity in feeding sites, and expression patterns follow those observed in uninfected root vascular tissues. These observations differ from promoters of other cell cycle genes like within *CYCB1;1pro:GUS* fusion which is early induced in gall tissue and is not expressed in the root vascular cylinder where the feeding site arise.

***KRP* loss-of-function leads to onset of cell wall stubs in giant cells and provokes mitosis in surrounding cells**

Morphological analysis of galls induced in the loss-of-function of *krp3*, *krp5* and *krp7* mutant lines showed increased presence of cell wall stubs in giant cells indicating incomplete cytokinesis, suggestive of the induction of a mitotic state in these feeding cells (Fig. S2). Apparently, more nuclei were visible in gall sections but due to their clustering, numbers could not be recorded. These giant cells presented reduced size compared to wild-type. As well, neighboring cells in the *krp3* line proliferate more as compared to wild-type galls. Sanz et al. (2011) have suggested that loss of function in the *krp2* lines of *Arabidopsis* may result in augmented levels of CYCD/CDKA activity, enhancing the potential for cell division. Genes involved in mitosis activation as CDKs and cyclins have been reported to be early activated in galls (de Almeida Engler et al., 1999). Lack of KRPs may lead to increased CDKA;1 concentration in gall tissue contributing to the activation of CDK/CYC complexes (Vieira et al., 2013; Boruc et al., 2010) driving cells to enter faster into mitosis during gall development

(de Almeida Engler and Gheysen, 2012). Smaller giant cells observed in the *krp3* line disturbed nematode maturation and reproduction. Decreased female maturation might have been caused by lack of enough nutrients within smaller giant cells.

Ectopic *KRP3* expression influences giant cell and nuclei shape gall and affects ploidy levels in feeding sites

Lines ectopically expressing the three *KRPs* (*35S:KRP3-GFP*, *35S:GFP-KRP5* and *35S:KRP7-GFP*), (not yet analyzed upon nematode infection) were generated and challenged by the pathogen. Previous functional analysis of *KRP1*, *KRP2*, *KRP4* and *KRP6* demonstrated that different *KRPs* might exert distinct functions in plant cells as well as in galls (Vieira et al., 2012, 2013 and Vieira et al., submitted). Therefore it became relevant to investigate the function of the remaining *KRPs* (*KRP3*, *KRP5* and *KRP7*) during nematode feeding site development. All three *KRPs* (*KRP3*, *KRP5* and *KRP7*) were reported to bind CDKA;1, essential both for G1/S and G2/S transition (Van Leene et al., 2010; De Veylder et al., 2011). In addition, all *KRPs* bind to CDK complexed D-type cyclin (De Veylder et al., 2001; Verkest et al., 2005; Boruc et al., 2010; Van Leene et al., 2010).

Curiously, histological observations of the ectopic expression of three *KRP* genes affected somewhat gall morphology compared to wild-type galls. Giant cells appeared smaller and for *KRP7^{OE}* lines neighboring cells were disordered compared to wild-type. Nevertheless, *KRP3^{OE}* line revealed the most noteworthy change in gall morphology, presenting smaller but elongated giant cells compared to the large and rounded wild-type giant cells. Ectopic *KRP3* expression caused the most notable decrease in gall size due to the combined effect of fewer neighboring cells and reduced giant cell size.

KRP3 has been reported as a gene with unique functions in shoot apical meristem (SAM) and leaves (Jun et al., 2013). Plants overexpressing *KRP3* showed reduced organ size, serrated leaves and reduced fertility, and displayed higher DNA ploidy level in both the SAM and leaf tissues. These data hint that *KRP3* exerts a negative regulatory role in the mitotic cell cycle but stimulates endoreduplication in the SAM and leaves (Jun et al., 2013). Here, ectopic *KRP3* expression most likely caused the inhibition of CDK/CYC complexes compromising gall expansion. Thus, ectopic expression of *KRP3* will possibly provoke inactivation of mitotic CDKs and thereby inhibiting mitotic activity in young GCs. Neighboring cells, which normally proliferate will be strongly reduced in number. Reduced nuclear divisions in young giant cells combined with the decreased mitotic activity of neighboring cells resulted in severe reduction in gall size compromising the nematode's life cycle with strong decrease in progeny. Development of the NFS during RKN parasitism seems to imply a strict involvement and regulation of both the mitotic and endoreduplication cycles (de Almeida Engler et al., 1999, 2012). The endocycle is characterized by the occurrence of recurring cycles of DNA duplication in cells that do not go through mitosis. Thus, repeated endocycle events will result in duplicated chromatids that continue associated within a sole chromocenter (Comai, 2005). The giant cell nuclei we observe in the *KRP3*^{OE} line presented a convoluted shape suggesting that nuclei might be connected. This phenotype was observed by confocal microscopy analysis of cleared PI stained giant cell nuclei as well as by *in vivo* observations using a *KRP3-GFP* fusion line. The importance of polyploidization for gall maturation has been demonstrated recently through the observation that giant cell nuclei size and expansion are dramatically affected in plants with impaired endocycle machinery (de Almeida Engler *et al.*, 2012). While nuclei of *Arabidopsis* root cells may undertake up

to four rounds of endoreduplication, attaining a maximum of 16C, flow cytometry examination of wild-type galls uncovered nuclei with up to 128C. The variation in the higher ploidy levels (8C to 128C) represents nuclei of variable sizes observed in GCs. Convoluted *KRP3*^{OE} giant cell nuclei also reached up to 128C ploidy levels, displaying somewhat higher percentage of nuclei with higher DNA content, when compared to wild-type gall nuclei. The low (2C to 4C) ploidy levels originate from cells neighboring the giant-feeding cells, that constantly divide during gall formation. It is known that the effect of cell cycle inhibitors is concentration dependent (Verkest et al., 2005; Roeder et al., 2010). Ectopic *KRP3* expression in galls shows primarily to negatively affect mitotic activity. Jun et al. (2013) observed decreased cell number in the shoot apical meristem and presenting altered and irregularly cell sized compared to wild-type. The elongated phenotype in the *KRP3*^{OE} line never observed in wild-type *Arabidopsis* giant cells suggests *KRP3* interference in cell expansion and differentiation. Artificial *KRP3* expression caused an elongated giant cell shape at very early stages of gall development. The strong reduction in gall size observed during *KRP3* overexpression is thus probably a direct consequence of the drastic reduction in cell number in galls due to mitotic inhibition. All together, our data suggest that *KRP3* is an important player in the regulation of host cell division and cell enlargement during nematode induced gall morphogenesis.

Concluding remarks

The functional characterisation performed herein of three cell cycle inhibitor genes (*KRP3*, *KRP5* and *KRP7*) has highlighted interesting features of the *KRP3* gene. Ectopic *KRP3* expression revealed that the typical swelling, or gall, caused by nematode infection is significantly decreased and nematode maturation is inhibited.

KRP3 gene is naturally not expressed in galls and therefore ectopic expression of non- or weakly expressed *KRPs* like *KRP3* might lead to the inactivation of CDKA/CYCD complexes disturbing progression of the cell cycle and thereby interfering with giant cell fate and survival. Detailed analysis of the diverse members of the *KRP* multi-gene family allowed us to select the most effective and robust inhibitor(s) suited for developing new strategies to decrease nematode propagation by inhibiting normal feeding site development.

Engineering ectopic expression of not-expressed *KRP* inhibitors in giant cells such as *KRP3* might still be considered a possible approach for root-knot nematode control but only when under the control of a gall specific promoter.

Acknowledgments

We thank, C. Escudero, M.Y. Serrano and I.M. Torres for helping with *KRP* mutant analyses. We thank J. Boruc and E. Russinova for kindly providing primary transformants of *KRPs* overexpressing lines. R. C. has been supported by a doctoral scholarship in Brazil from CNPq (process number: 143030/2009-4) and in France from CAPES (process number: 6585-11-6). P.V. has been supported by a doctoral scholarship from Fundação para a Ciência e Tecnologia, from Portugal (SFHR\BD\41339\2007).

References

- Beeckman, T., and Engler, G. 1994. An easy technique for the clearing of histochemically stained plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:37-42.
- Boruc, J., Van den Daele, H., Hollunder, J., Rombauts, S., Mylle, E., Hilson, P., Inzé, D., De Veylder, L., and Russinova, E. 2010. Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network. *Plant Cell* 22:1264-1280.

- Davis, E.L., Hussey, R.S., and Baum, T.J. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20:134-141.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews in Genetics* 6: 836-846.
- de Almeida Engler, J., and Gheysen, G. 2012. Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: Why and How? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:17-24.
- de Almeida Engler, J., Engler, G., and Gheysen, G. 2011. Unravelling the plant cell cycle in nematode induced feeding sites. Pages 349-368 in *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll, eds. Springer Science + Business Media B.V., Springer Netherlands.
- de Almeida Engler, J., De Vleeschauwer, V., Burssens, S., Celenza, J.L., Inzé, D., Van Montagu, M., Engler, G., and Gheysen, G. 1999. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell* 11:793-807.
- de Almeida Engler, J., Kyndt, T., Vieira, P., Van Cappelle, E., Boudolf, V., Sanchez, V., Escobar, C., De Veylder, L., Engler, G., Abad, P., and Gheysen, G. 2012. CCS52 and DEL1 genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *The Plant Journal* 72:185-198.
- De Veylder, L., Larkin, J.C., and Schnittger, A. 2011. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in Plant Science* 16:624-634.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inzé, D. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:1653-1668.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., and Knapp, S. 1991. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 96:985-989.
- Gheysen, G., and Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40:191-219.
- Hoth, S., Stadler, R., Sauer, N., and Hammes, U.Z. 2008. Differential vascularization of nematode-induced feeding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:12617-12622.
- Huang, C.S. 1985. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. Pages 155-164 in *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume I, Biology and Control, J.N. Sasser and C.C. Carter, eds. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC.
- Inzé, D., and De Veylder, L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 40:77-105.
- Jones, M.G.K., and Northcote, D.H. 1972. Multinucleate transfer cells induced in coleus roots by the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. *Protoplasma* 75:381-395.
- Jun, S., Okushima, Y., Nam, J., Umeda, M., and Kim, G.-T. 2013. Kip-related protein 3 is required for control of endoreduplication in the shoot apical meristem and leaves of *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* 35:47-53.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. 2002. GATEWAY" vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7:193-195.
- Menges, M., and Murray, J.A. 2002. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *The Plant Journal* 30:203-212.

- Menges, M., De Jager, S.M., Gruijsem, W., and Murray, J.A.H. 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal* 41:546-566.
- Moens, M., Perry, R.N., and Starr, J.L. 2009. Meloidogyne species- a diverse group of novel and important plant parasites. Pages 1-17 in Root-knot nematodes, M. Moens, R.N. Perry and J.L. Starr, eds. CABI International, Oxfordshire, UK.
- Neveu, C.d., Jaubert, S.p., Abad, P., and Castagnone-Sereno, P. 2003. A set of genes differentially expressed between avirulent and virulent *Meloidogyne incognita* near-isogenic lines encode secreted proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:1077-1084.
- Niebel, A., De Almeida Engler, J., Hemerly, A., Ferreira, P., Van Montagu, M., and Gheysen, G. 1996. Induction of *cdc2a* and *cyc1At* expression in *Arabidopsis* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. *The Plant Journal* 10:1037-1031-1043.
- Ormenese, S., de Almeida Engler, J., De Groot, R., De Veylder, L., Inzé, D., and Jacquard, A. 2004. Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 93:575-580.
- Roeder, A.H., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., and Meyerowitz, E.M. 2010. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology* 8:e1000367.
- Sanz, L., Dewitte, W., Forzani, C., Patell, F., Nieuwland, J., Wen, B., Quelhas, P., De Jager, S., Titmus, C., Campilho, A.I., Ren, H., Estelle, M., Wang, H., and Murray, J.A.H. 2011. The *Arabidopsis* D-Type Cyclin CYCD2;1 and the Inhibitor ICK2/KRP2 Modulate Auxin-Induced Lateral Root Formation. *The Plant* 23:641-660.
- Sijmons, P.C., Atkinson, H.J., and Wyss, U. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:235-259.
- Van Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., Russinova, E., and De Veylder, L. 2011. A kaleidoscopic view of the *Arabidopsis* core cell cycle interactome. *Trends in Plant Science* 16:141-150.
- Verkest, A., Weinel, C., Inzé, D., De Veylder, L., and Schnittger, A. 2005. Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiology* 139:1099-1106.
- Vieira, P., Engler, G., and de Almeida Engler, J. 2012. Whole-mount confocal imaging of nuclei in giant feeding cells induced by root-knot nematodes in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 195:488-496.
- Vieira, P., Escudero, C., Rodiuc, N., Boruc, J., Russinova, E., Glab, N., Mota, M., De Veylder, L., Abad, P., Engler, G., and De Almeida Engler, J. 2013. Ectopic expression of Kip-related proteins restrains root-knot nematode-feeding site expansion. *New Phytol* 199:505-519.
- Wang, H., Zhou, Y., and Fowke, L.C. 2006. The emerging importance of cyclin-dependent kinase inhibitors in the regulation of the plant cell cycle and related processes. *Canadian Journal of Botany* 84:640-650.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Expression patterns of the three KRP_{pro}:GUS Arabidopsis lines during gall development. Whole-mount localization of GUS staining revealed high KRP5 promoter activity at different stages (7, 14 and 21 DAI) of gall development, but no or few activity of KRP3 and KRP7 promoters at the same time points. Scale bars = 100 μm .

Figure S2. Histological analysis of gall tissues in *krp* knockout lines of Arabidopsis upon infection with *M. incognita*. Bright-field images of longitudinal sections of galls stained with toluidine blue in wild-type, *krp3*, *krp5* and *krp7* mutants at different stages of nematode infection (7, 14 and 21 DAI). In *krp3* and *krp7* mutant lines cell wall stubs are observed from 14 DAI to 21 DAI. We observed apparently increased nuclear division in *krp3* and *krp5* lines, as well an elevated proliferation of neighboring cells compared to wild-type gall more evident in the *krp3* knockout line. Asterisk, giant cell; n, nematode. Bars = 50 μm .

Figure S3. Nematode infection tests of *krp3* and *krp5* lines compared to wild-type Col-0. (A) Giant cell surface (μm^2) measurements of wild type plants and *krp3* knockout line at different stages of nematode infection (7, 14 and 21 DAI). Measurements were made on a minimum of 30 giant cell sections (only the 2-3 largest giant cells were measured per gall). Letters a and b represent significant difference of 5% of probability in each time point. (B) Nematode infection tests of *krp3* knockout line compared to the wild-type. Data shown in A represents means \pm SD of number of galls and egg masses. Pairwise comparisons were made by Student's t-test ($P \leq 0.001$). (C) Nematode infection tests of *krp5* knockout line compared to the wild-type. Data shown in A represents means \pm SD of number of galls and egg masses. Pairwise comparisons were made by Student's t-test ($P \leq 0.001$). (D) Acid fuchsin staining of galls at 30DAI. In a number of *krp3* and *krp5* galls the females did not reach maturity and consequently did not produce eggs. e, eggs; G, gall; n, nematode. Scale bars = 50 μm .

Figure S4. Plant morphology of KRP overexpression lines used for *M. incognita* inoculation assays.

(A) Phenotype of wild-type (Col-0) plants compared to KRP3^{OE} (35S::KRP3-GFP), KRP5^{OE} (35S::GFP-KRP5) and KRP7^{OE} (35S::GFP-KRP7) lines. (B) Nuclear localization of KRP3, KRP5 and KRP7 in Arabidopsis root cells. The KRP3 protein also localized to sub-nuclear dots. (C) The transcript levels of KRP^{OE} lines were examined by RT-PCR-based DNA gel blot analysis and showed highest transcript levels in the KRP3^{OE} in the KRP7^{OE} line (D) Root apical meristem morphology in wild-type and KRP3, KRP5 and KRP7 overexpressing Arabidopsis roots are apparently smaller than in wild-type. Scale bars = 50 μ m.

Table S1. Primers used for RT-PCR reactions.

FIGURES LEGEND

Figure 1. Expression pattern of three KRPpro:GUS lines in galls of Arabidopsis roots infected with *M. incognita*. Promoter activity of KRP3, KRP5 and KRP7 during gall development (3, 7, 14 and 21 days after inoculation). Dark-field images illustrate GUS staining in red. Asterisk, giant cell; n, nematode; NC, neighboring cells. Scale bars = 50 μ m.

Figure 2. Ectopic KRP expression significantly affects the size of galls induced by *M. incognita*. Histological analysis of nematode-induced wild-type galls compared to KRP3^{OE}, KRP5^{OE} and KRP7^{OE} lines at different phases of nematode infection (7, 14, 21 and 40 DAI). Bright-field images of longitudinal gall sections stained with toluidine blue. Note that in lines with ectopic KRP3 expression giant cells are elongated and the number of neighboring cells is significantly reduced. Asterisk, giant cell; n, nematode. Scale bars = 50 μ m.

Figure 3. Giant cell surface (μ m²) measurements of wild-type plants and KRP3 overexpressing line at different stages of nematode infection (7, 14, 21 and 40 DAI). Measurements were made on a minimum of 30 giant cell sections (only the 2-3 largest giant cells were measured per gall). Letters a and b represent significant difference of 5% of probability in each time point.

Figure 4. Nuclear reorganization and flow cytometry analysis in KRP3^{OE} galls induced by *M. incognita* in Arabidopsis roots. (A-B) 3D confocal projections of serial optical sections of whole-mount gall sample cleared and stained with propidium iodide. (A) Wild-type gall 20 DAI. (B) KRP3^{OE} gall 30 DAI. Less nuclei apparently connected are observed in giant cells of KRP3^{OE} galls. Bright PI stained spots are seen in nuclei with variable intensities, indicative of chromocentric regions and/or heterochromatin foci. Scale bars A,B = 20 μ m. (C) Percentage of ploidy levels of nuclei in gall-less wild-type root segments compared to KRP3^{OE}. (D) Percentage of ploidy levels in galls (30 DAI). Increase in nuclei with high ploidy levels was observed in KRP3^{OE} galls (>16C) compared to nuclei of wild-type galls.

Figure 5: KRP3-GFP, GFP-KRP5 and GFP-KRP7 localization in Arabidopsis during cell division. Time lapse during mitotic cell division in *Arabidopsis* root cells show co-localization with chromosomes (arrows).

Figure 6. KRP3 protein localization in giant cells during nematode parasitism in a gall 30 DAI. (A, A') GFP-KRP3 localization in giant cells nuclei (arrow) and a close up in B, B' showing elongated nuclei which seem connected. Scale bars = 20 μ m.

Figure 7. Nematode infection tests of KRP3^{OE} compared to wild-type Col-0. (A) Nematode infection tests of KRP3 overexpressing line compared to the wild-type. Data shown in A represents means \pm SD of Galls and egg masses. Pairwise comparisons were made by Student's t-test ($P \leq 0.001$). (B) Acid fuchsin staining of galls at 30DAI. Galls in KRP3^{OE} line are tiny compared to the wild-type. In most galls the females have not reached maturity and consequently did not produce eggs. e, eggs; G, gall; n, nematode. Scale bars = 50 μ m.

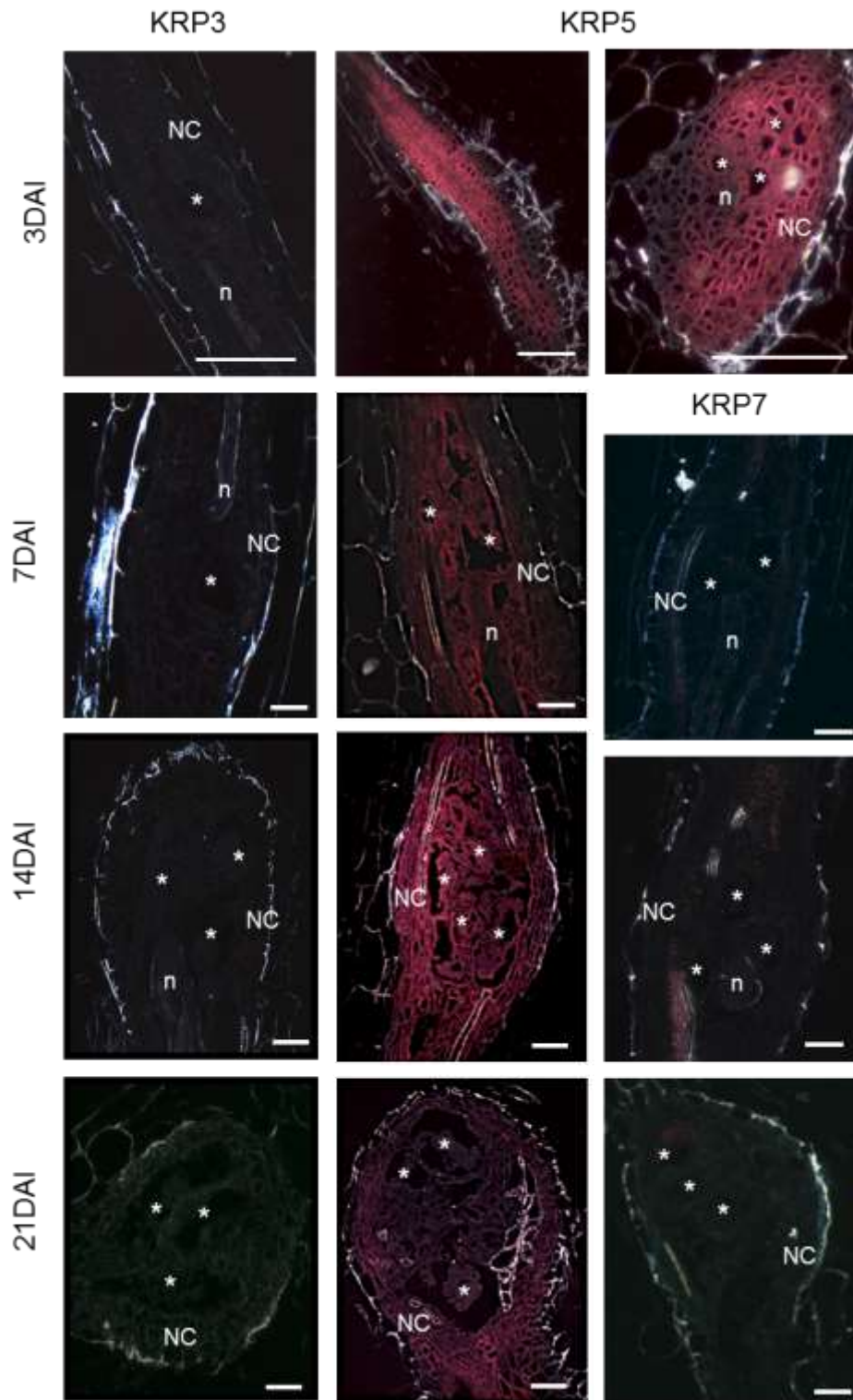


Figure 1. Expression pattern of three KRPpro:GUS lines in galls of *Arabidopsis* roots infected with *M. incognita*. Promoter activity of KRP3, KRP5 and KRP7 during gall development (3, 7, 14 and 21 days after inoculation). Dark-field images illustrate GUS staining in red. Asterisk, giant cell; n, nematode; NC, neighboring cells. Scale bars = 50 μ m.

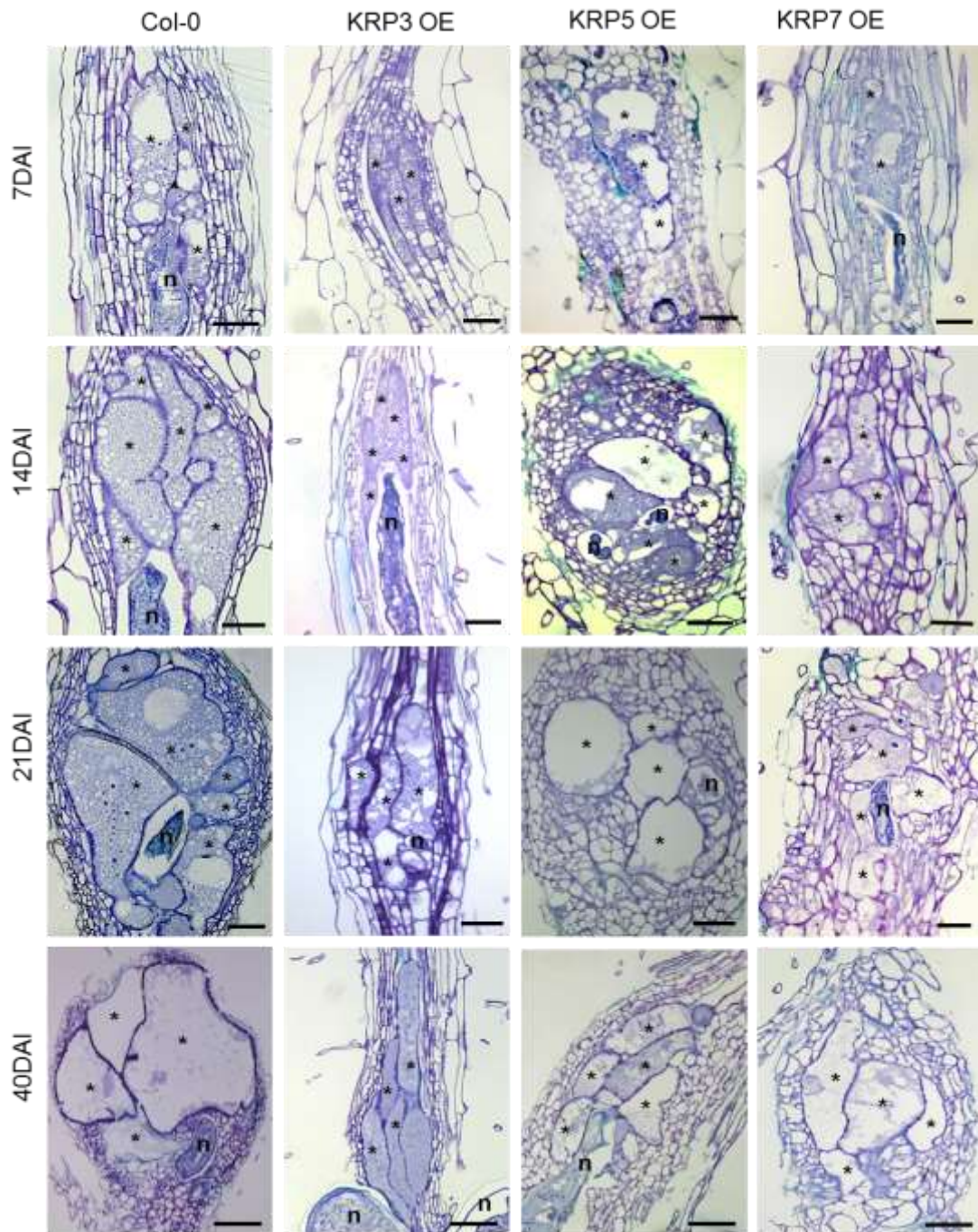


Figure 2. Ectopic KRP expression significantly affects the size of galls induced by *M. incognita*. Histological analysis of nematode-induced wild-type galls compared to KRP3^{OE}, KRP5^{OE} and KRP7^{OE} lines at different phases of nematode infection (7, 14, 21 and 40 DAI). Bright-field images of longitudinal gall sections stained with toluidine blue. Note that in lines with ectopic KRP3 expression giant cells are elongated and the number of neighboring cells is significantly reduced. Asterisk, giant cell; n, nematode. Scale bars = 50 µm.

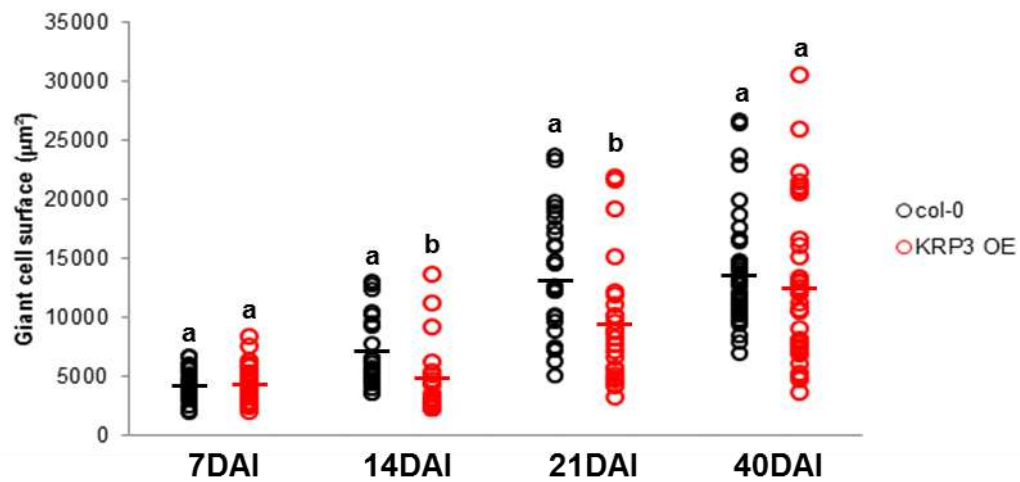


Figure 3. Giant cell surface (μm^2) measurements of wild-type plants and KRP3 overexpressing line at different stages of nematode infection (7, 14, 21 and 40 DAI). Measurements were made on a minimum of 30 giant cell sections (only the 2-3 largest giant cells were measured per gall). Letters a and b represent significant difference of 5% of probability in each time point.

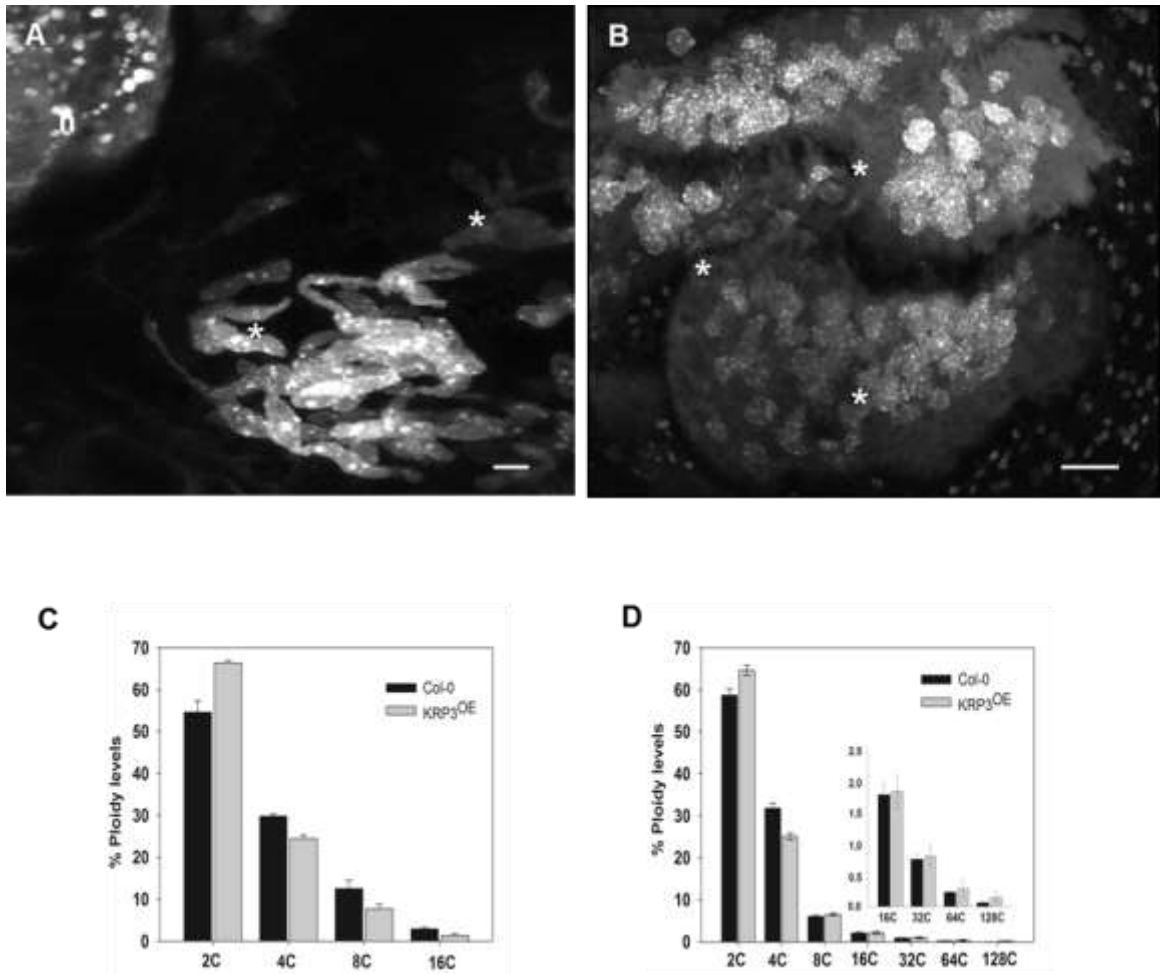


Figure 4. Nuclear reorganization and flow cytometry analysis in KRP3^{OE} galls induced by *M. incognita* in *Arabidopsis* roots. (A-B) 3D confocal projections of serial optical sections of whole-mount gall sample cleared and stained with propidium iodide. (A) Wild-type gall 20 DAI. (B) KRP3^{OE} gall 30 DAI. Less nuclei apparently connected are observed in giant cells of KRP3^{OE} galls. Bright PI stained spots are seen in nuclei with variable intensities, indicative of chromocentric regions and/or heterochromatin foci. Scale bars A,B = 20 μ m. (C) Percentage of ploidy levels of nuclei in gall-less wild-type root segments compared to KRP3^{OE}. (D) Percentage of ploidy levels in galls (30 DAI). Increase in nuclei with high ploidy levels was observed in KRP3^{OE} galls (>16C) compared to nuclei of wild-type galls.

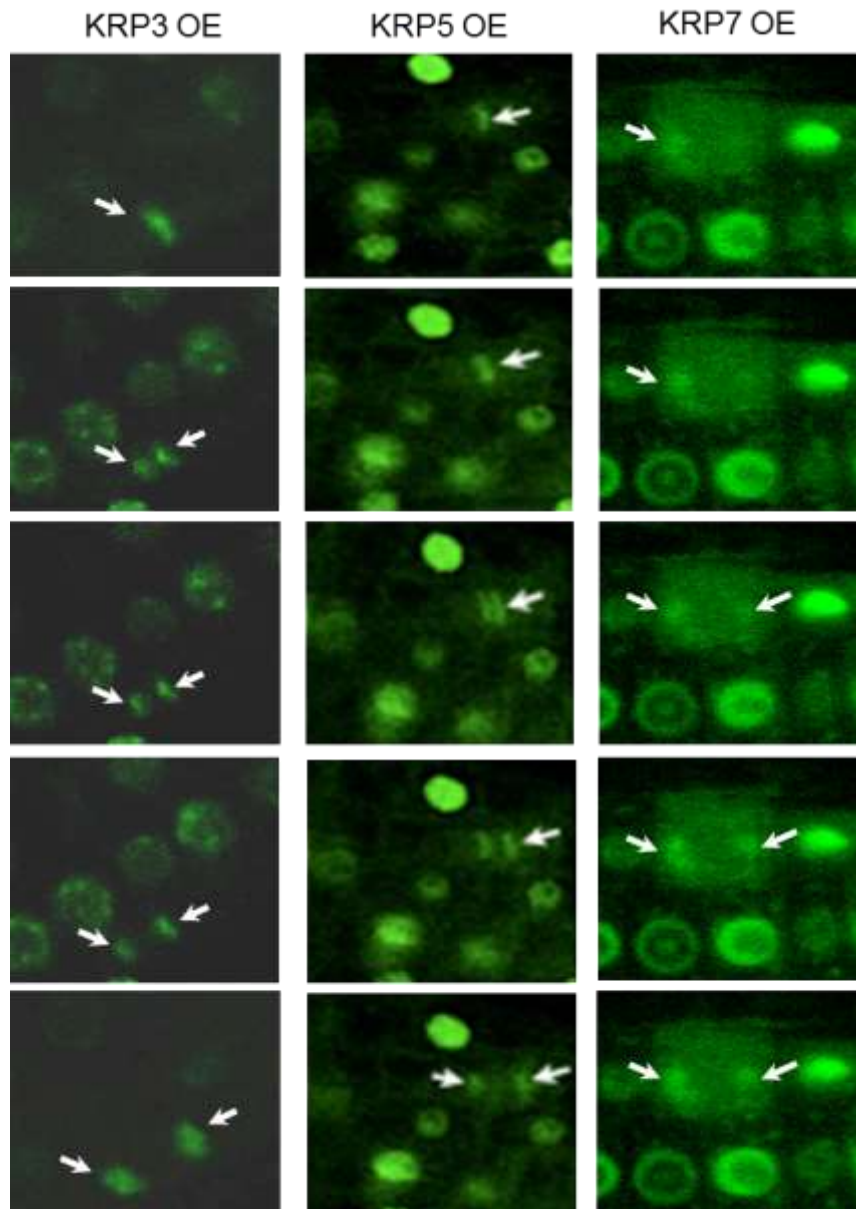


Figure 5: KRP3-GFP, GFP-KRP5 and GFP-KRP7 localization in *Arabidopsis* during cell division. Time lapse during mitotic cell division in *Arabidopsis* root cells show co-localization with chromosomes (arrows).

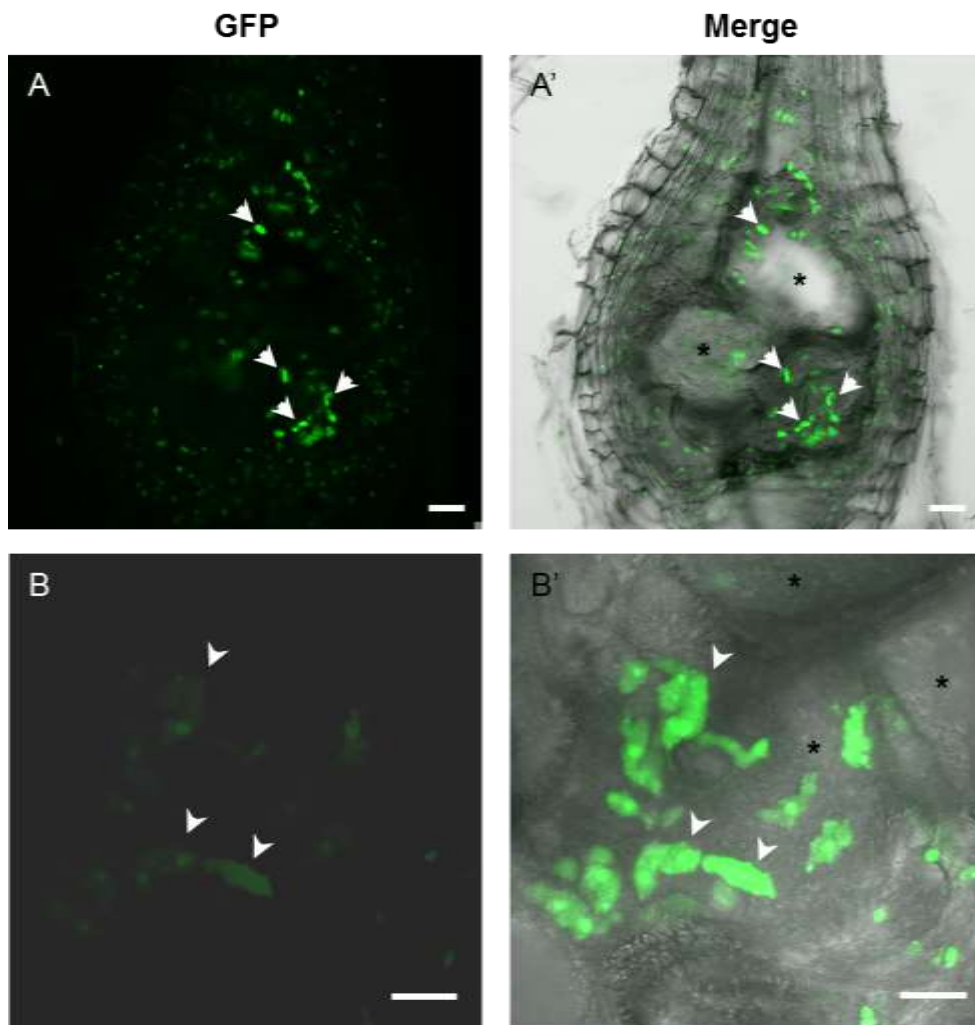


Figure 6. KRP3 protein localization in giant cells during nematode parasitism in a gall 30 DAI. (A, A') GFP-KRP3 localization in giant cells nuclei (arrow) and a close up in B, B' showing elongated nuclei which seem connected . Scale bars = 20 μm.

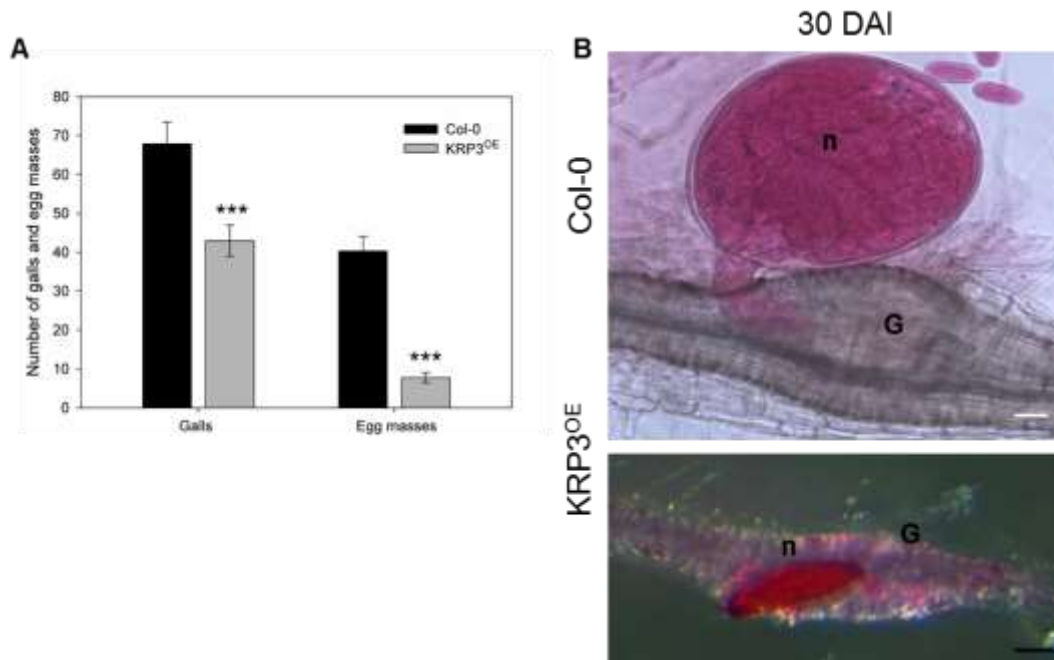


Figure 7. Nematode infection tests of KRP3^{OE} compared to wild-type Col-0. (A) Nematode infection tests of KRP3 overexpressing line compared to the wild-type. Data shown in A represents means \pm SD of Galls and egg masses. Pairwise comparisons were made by Student's t-test ($P \leq 0.001$). (B) Acid fuchsin staining of galls at 30DAI. Galls in KRP3^{OE} line are tiny compared to the wild-type. In most galls the females have not reached maturity and consequently did not produce eggs. e, eggs; G, gall; n, nematode. Scale bars = 50 μ m.

Table S1. List of primers used for RT-PCR.

Target gene	Primer forward (5'-3')	Tm (°C)	Primer reverse (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
KRP3	CACGAGGTCGATGTGCAG	58.23	GCCTCTGTTGCTGCTGCT	60.67	116
KRP5	CCCACCCGCTCTAGGTTT	58.60	TCCGGAGCTGGAGGTAGTT	59.61	113
KRP7	ACGCAGGCAGAGCTTGAT	59.33	CCCACTGGTACCGACCTTC	59.40	121
EF1	GCTCTATGGAAGTTCGAGACCAC	60.74	GGTGTGGCAATCGAGAACTG	59.20	834
OXA1	TACCTGATCTGCCTCCACCT	59.66	AACAGGACTCAGCGATGTTG	58.20	161

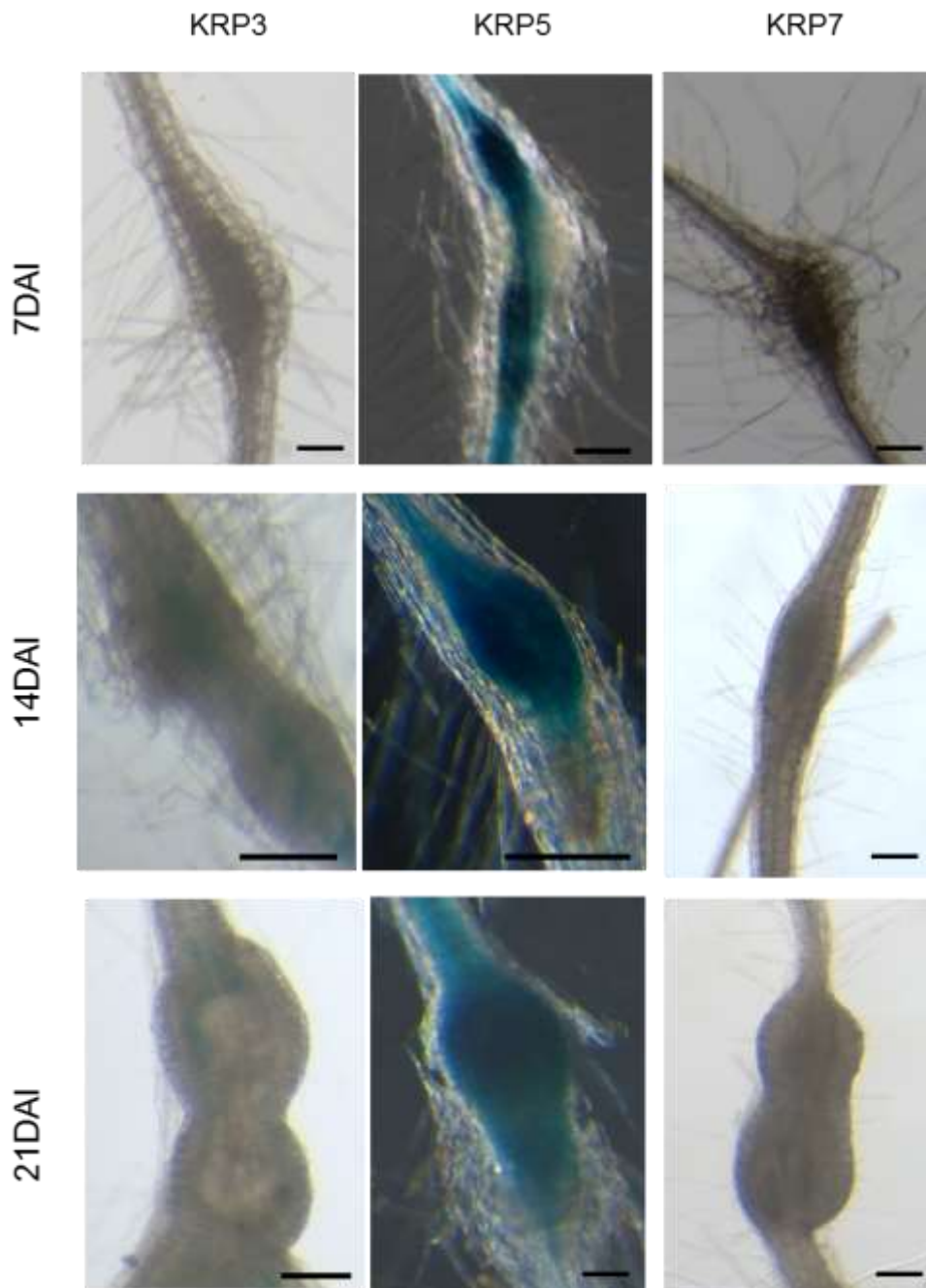


Figure S1. Expression patterns of the three KRPpro:GUS Arabidopsis lines during gall development. Whole-mount localization of GUS staining revealed high KRP5 promoter activity at different stages (7, 14 and 21 DAI) of gall development, but no or few activity of KRP3 and KRP7 promoters at the same time points. Scale bars = 100 μ m.

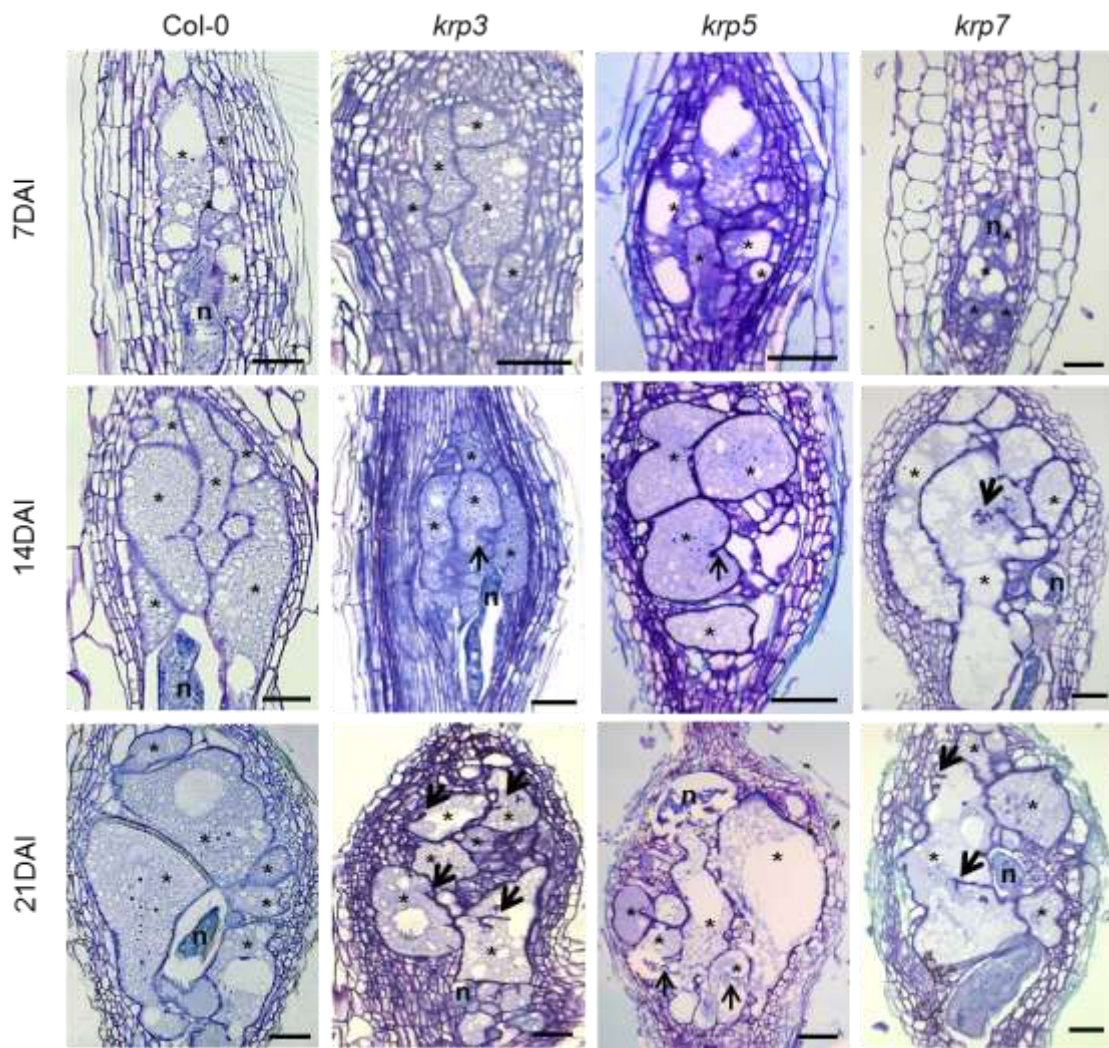


Figure S2. Histological analysis of gall tissues in *krp* knockout lines of *Arabidopsis* upon infection with *M. incognita*. Bright-field images of longitudinal sections of galls stained with toluidine blue in wild-type, *krp3*, *krp5* and *krp7* mutants at different stages of nematode infection (7, 14 and 21 DAI). In *krp3* and *krp7* mutant lines cell wall stubs are observed from 14 DAI to 21 DAI. We observed apparently increased nuclear division in *krp3* and *krp5* lines, as well an elevated proliferation of neighboring cells compared to wild-type gall more evident in the *krp3* knockout line. Asterisk, giant cell; n, nematode. Bars = 50 μ m.

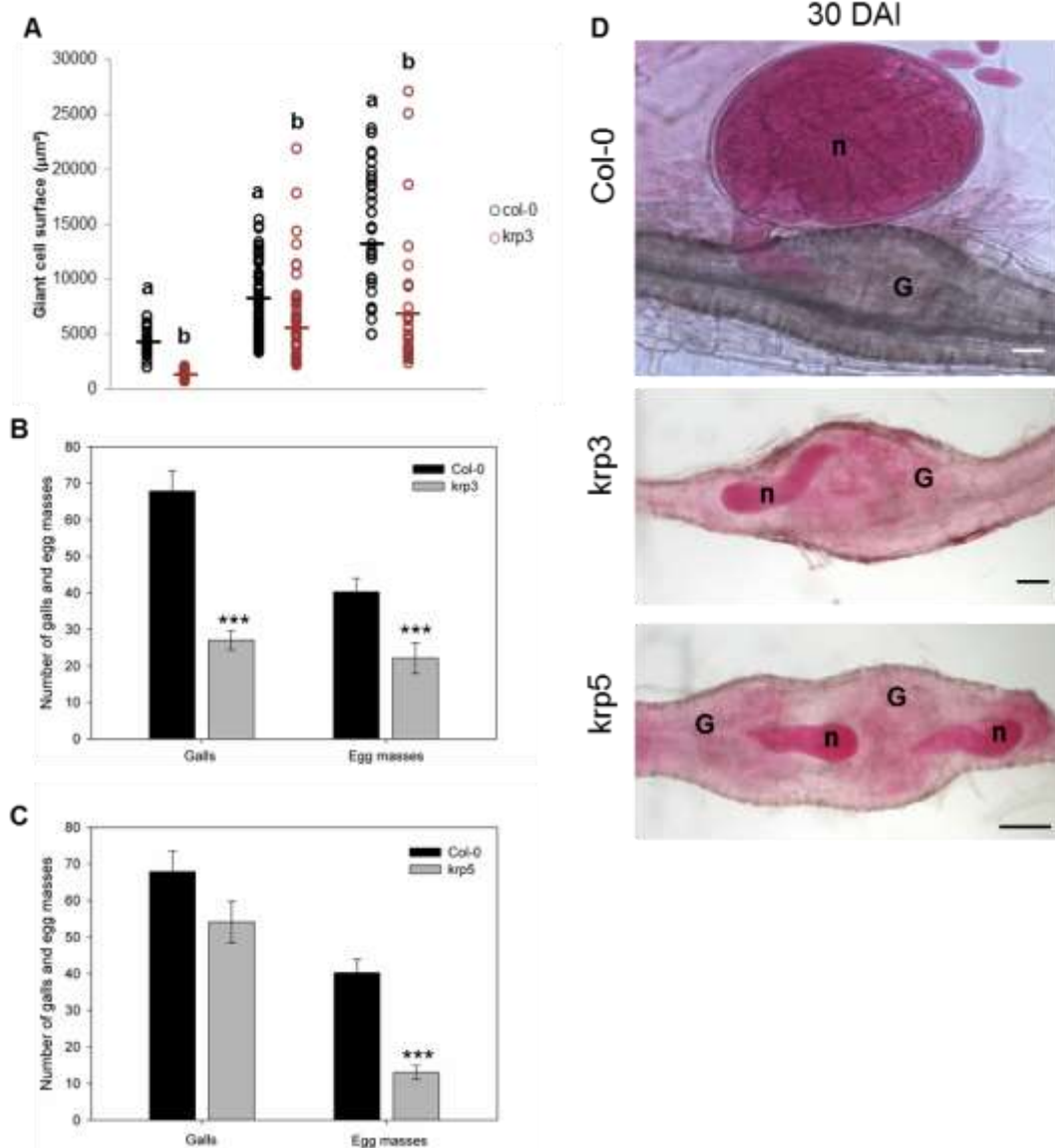


Figure S3. Nematode infection tests of *krp3* and *krp5* lines compared to wild-type Col-0. (A) Giant cell surface (μm^2) measurements of wild type plants and *krp3* knockout line at different stages of nematode infection (7, 14 and 21 DAI). Measurements were made on a minimum of 30 giant cell sections (only the 2-3 largest giant cells were measured per gall). Letters a and b represent significant difference of 5% of probability in each time point. (B) Nematode infection tests of *krp3* knockout line compared to the wild-type. Data shown in A represents means \pm SD of number of galls and egg masses. Pairwise comparisons were made by Student's t-test ($P \leq 0.001$). (C) Nematode infection tests of *krp5* knockout line compared to the wild-type. Data shown in A represents means \pm SD of number of galls and egg masses. Pairwise comparisons were made by Student's t-test ($P \leq 0.001$). (D) Acid fuchsin staining of galls at 30DAI. In a number of *krp3* and *krp5* galls the females did not reach maturity and consequently did not produce eggs. e, eggs; G, gall; n, nematode. Scale bars = 50 μm .

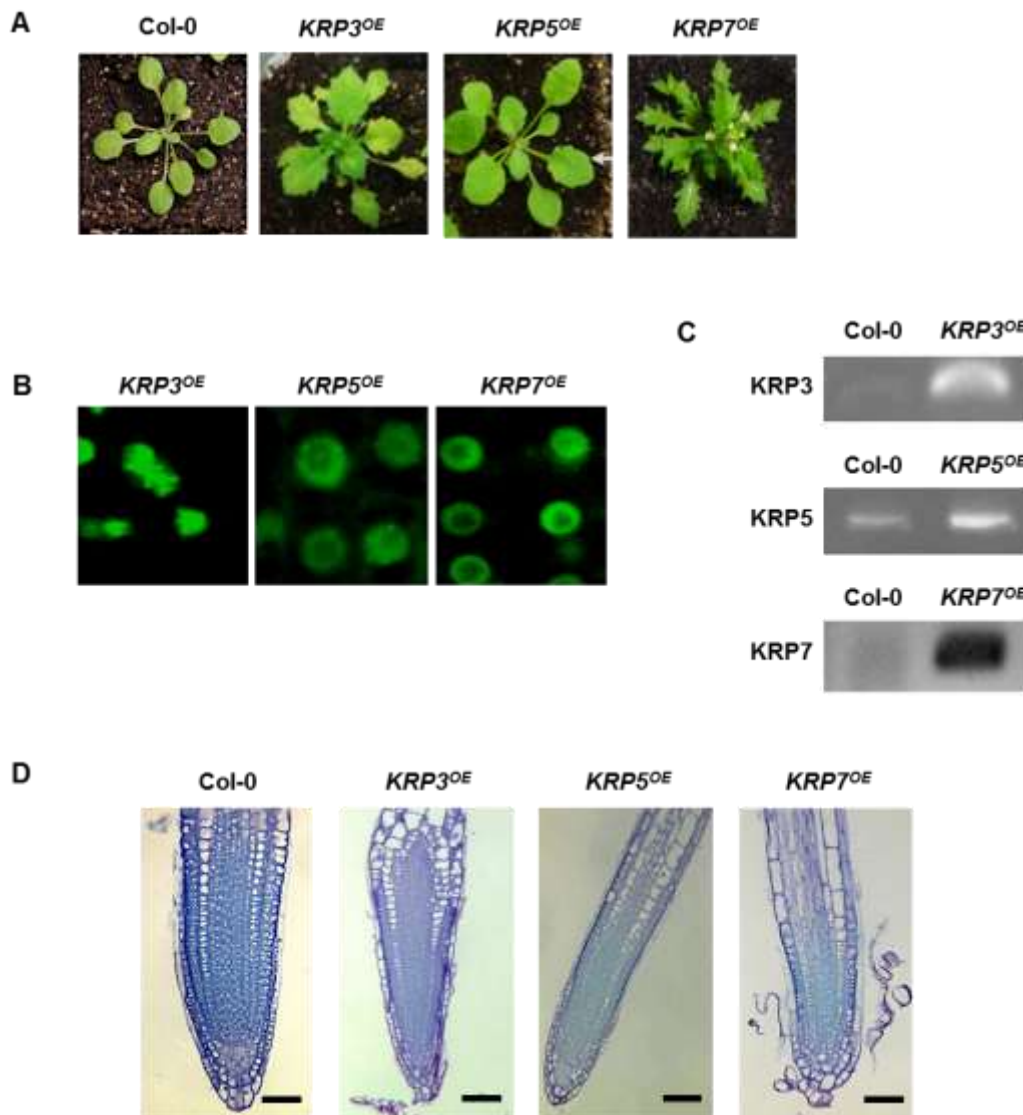


Figure S4. Plant morphology of KRP overexpression lines used for *M. incognita* inoculation assays. (A) Phenotype of wild-type (Col-0) plants compared to *KRP3^{OE}* (35S::KRP3-GFP), *KRP5^{OE}* (35S::GFP-KRP5) and *KRP7^{OE}* (35S::GFP-KRP7) lines. (B) Nuclear localization of KRP3, KRP5 and KRP7 in Arabidopsis root cells. The KRP3 protein also localized to sub-nuclear dots. (C) The transcript levels of *KRP^{OE}* lines were examined by RT-PCR-based DNA gel blot analysis and showed highest transcript levels in the *KRP3^{OE}* in the *KRP7^{OE}* line (D) Root apical meristem morphology in wild-type and *KRP3*, *KRP5* and *KRP7* overexpressing Arabidopsis roots are apparently smaller than in wild-type. Scale bars = 50 μ m.

4. ANEXOS

Publicações da aluna

Artigos relacionados a tese:

Coelho, R. R.; A. A. P.; Firmino; J. D. A. de Souza Júnior; M. C. M. Silva; M. F. Grossi de Sá. Identification of suitable internal control genes for expression studies in different organs or developmental stages of *Anthonomus grandis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Em preparação.

Coelho, R. R.; J. D. A. de Souza Júnior; A. A. P.; Firmino; L. L. P. Macedo; M. C. M. Silva; J. de Almeida Engler; M. F. Grossi de Sá. dsRNA-mediated interference of Vitellogenin gene affects *Anthonomus grandis* embryonary development. **Plos One**. Em preparação.

Coelho, R. R.; P. Vieira; J. D. A. de Souza Júnior; N. Rodiuc; L. De Veylder; M. F. Grossi de Sá; G. Engler; J. de Almeida Engler. On the track of unraveling the function of *KRP* cell cycle inhibitors during root-knot nematode feeding site development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Em preparação.

Patente relacionada a tese em preparação:

Controle genético de infestação do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) por silenciamento do gene *vitelogenina* mediado por RNA dupla fita.

Outras publicações:

Miranda, V. J.; R. R. Coelho; A. A. B. Viana; O. B. Oliveira Neto; R. M. D. G. Carneiro; T. L. Rocha; M. F. Grossi de Sá; R. R. Fragoso. 2013. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC Research Notes**, 6:196.

de Souza Júnior, J. D. A.; R. R. Coelho; I. T. Lourenço; R. R. Fragoso; A. A. B. Viana; L. L. P. Macedo; M. C. M. Silva; R. M. G. Carneiro; G. Engler; J. de Almeida-Engler; M. F. Grossi de Sá. Knocking-down *Meloidogyne incognita* proteases by plant delivered dsRNA has negative pleiotropic effect on nematode vigor. **Plos One**. Submetido.

Firmino, A. A. P.; F. C. A. Fonseca; L. L. P. Macedo; R. R. Coelho; J. D. A. de Souza Júnior; R. C. Togawa; O. B. Silva-Junior; G. J. Pappas-Jr; G. Engler⁵; M. F. Grossi de Sá. Transcriptome analysis in Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference mechanism in insect-pests. **Genome Biology**. Submetido.

Macedo, L. L. P.; F. C. A. Fonseca; A. A. P. Firmino; R. R. Coelho; R. R.; Fragoso; O. B. Oliveira-Neto; M. C. M. Silva; R. S. Oliveira; M. F. Grossi de Sá. A midgut-specific chitin synthase in *Anthonomus grandis* as target for pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Em preparação.

Macedo, L. L. P.; R. R. Coelho; M. C. M. Silva; R. S. Oliveira; M. F. Grossi de Sá. Physiological role of chitin synthase 2 involved in the synthesis of *Anthonomus grandis* peritrophic membrane. **Journal of Insect Physiology**. Em preparação.

Firmino, A. A. P.; D. M. de Sá; F. C. A. Fonseca; L. L. P. Macedo; R. R. Coelho; M. F. Grossi de Sá. Lethal Phenotype caused by RNAi-mediated Silencing of a Cotton Boll Weevil Laccase2 gene . **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Em preparação.

Outras patentes:

Grossi de Sá, M. F.; Figueiredo, L. H. M.; Macedo, L. L. P.; Firmino, A. A. P.; Fonseca, F. C. A.; Coelho, R. R.; Lourenco, I. T.; Silva, M. C. M.. Método e composição para controle genético de insetos-praga em plantas de algodão através do silenciamento de genes de lacases. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI1020120335069, data de depósito: 28/12/2012, título: "Método e composição para controle genético de insetos-praga em plantas de

algodão através do silenciamento de genes de lacases" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Grossi de Sa, M. F. ; Figueiredo, L. H. M.; Macedo, L. L. P.; Coelho, R. R.; Silva, M. C. M.; Fonseca, F. C. A.; Lourenco, I. T.; Firmino, A. A. P.. Método e composições para controle genético de insetos-praga em plantas de algodão através do silenciamento de genes de quitina sintases. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI1020120335395, data de depósito: 28/12/2012, título: "Método e composições para controle genético de insetos-praga em plantas de algodão através do silenciamento de genes de quitina sintases" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.