



**UnB**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Análise Funcional de Genes de  
*Meloidogyne incognita* Envolvidos  
na Interação Planta-Nematoide**

**José Dijair Antonino de Souza Júnior**

Brasília – DF

Novembro de 2011

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

**Análise Funcional de Genes de  
*Meloidogyne incognita* Envolvidos na  
Interação Planta-Nematoide**

**José Dijair Antonino de Souza Júnior**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima Grossi de Sá

Tese apresentada ao Departamento de  
Biologia Celular do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para à obtenção  
do grau de Doutor em Biologia  
Molecular

Brasília-DF, Novembro de 2011

## **BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Ângela Mehta**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Dr. Cléber Furlanetto**

Departamento de Fitopatologia

Universidade de Brasília – UnB

**Dr. Patricia Messeberg Guimarães**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

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

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Dr. Osmundo Brilhante Oliveira Neto (Suplente)**

Centro Universitário Unieuro

**Brasília-DF, Novembro de 2011**

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a minha orientadora de doutorado Dra. Maria Fátima Grossi de Sá por todo apoio, condições de trabalho, orientação, confiança no meu trabalho, paciência e amizade;
- Por estar comigo em todos os momentos do meu doutorado, nos bons e, principalmente, nos ruins, me dando apoio incondicional, tanto apoio moral como na bancada. Pelos dias inteiros que ficamos em pé extraíndo nematoides das raízes de tabaco. E principalmente, pelo amor, carinho, companheirismo e amizade. Minha amada esposa Roberta: Muito Obrigado! Eu te amo!
- Agradeço em especial a Dra. Regina Carneiro por todo o suporte no laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e por ter me ensinado o bê-á-bá da Nematologia;
- Agradeço aos amigos, colegas e colaboradores da Embrapa, principalmente dos Laboratórios de Interação Molecular Planta-Praga, Nematologia e Bioimagem, e aos professores da pós. Obrigado por toda a ajuda e dedicação.
- Agradeço também a Dra. Janice de Almeida-Engler e ao Dr. Gilbert Engler do INRA, França, por todo auxílio nas análises histológicas das raízes de tabaco;
- Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da UnB e ao CNPq pelo apoio financeiro dado por meio de bolsa de estudos.
- Agradeço especialmente aos componentes da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência para avaliar o meu trabalho;

- Sou muito agradecido ao Dr. Antonio Américo, Dr. Rodrigo Fragoso e Dr. Thales Rocha por todo apoio, esclarecimento e discussões científicas que tanto contribuíram para a realização deste trabalho;

- Agradeço a todos os amigos que fiz aqui em Brasília e especialmente a galera do LIMPP: Alexandre Firmino, André, Leonardo, Carol, Isabela, Raquel, Vívian, Itamara, Gustavo, Magda, Angelina, Tiago, Edílson, Ariane, Rafael, Dra. Cristina, Dra. Maria Eugênia, Flávia, Eduardo, Vanessa, Regina, Bruna, Wagner, Dr. Érico, Dr. Osmundo, Dra. Patrícia, Dra. Érika, Maíra, Diogo, Alessandra, Stefani, Fernando, Robertinha, Thiago, Felipe, Philippe, Stephan, Daniela e, em especial a Angélica, Lecir, Sheiska e Sineide por toda a ajuda e paciência.

- Agradeço aos amigos e colegas que já deixaram o Lab: Aulus, Hudson, Luciane, Mari Quezado, Anne, Tiago, Jorge, Arnúbio, Simoni, Erich, Djair, Charles, Fabiano e Kílvia;

- Agradeço muito as minhas famílias: meu pai Dijair, minha mãe Ana, meu avô Chico (*in memoriam*), minha avó Zefa, meus irmãos: Petrus, Victória, Daniel e Pedro Henrique; meus tios: Djalma, Djaci, Conceição, Meuri, Iolanda, Socorro, Gustavo, Maura, Janaína e Janaílton; meus primos, meu sogro Gustavo, minha sogra Márcia e a minha cunhada Gabriela, por todo amor, carinho e apoio durante estes 4 anos;

- Finalmente agradeço a Deus, Pai das Luzes, que me fez forte quando era fraco, que me deu alegria na hora da tristeza, que me deu sabedoria e discernimento em todos os momentos. Obrigado Pai!

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>I- INTRODUÇÃO</b>	
I.i. Introdução Geral	<b>1</b>
I.ii. Biologia do fitonematoide endoparasita sedentário <i>Meloidogyne incognita</i>	<b>2</b>
I.iii. Efeitores de parasitismo de fitonematoides	<b>3</b>
I.iv. Degradação de <i>Meloidogyne incognita</i>	<b>6</b>
I.v. RNA interferente (RNAi)	<b>9</b>
I.vi. O uso de RNA interferente (RNAi) como estratégia na genômica funcional e estratégia de controle de fitonematoides	<b>11</b>
I.vii. Referências	<b>14</b>
<b>II – HIPÓTESES</b>	<b>27</b>
<b>III – JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>IV – OBJETIVO GERAL</b>	<b>28</b>
<b>V - CAPÍTULOS</b>	
<b>CAPÍTULO 1: Avaliação funcional de genes de <i>Meloidogyne incognita</i>: interferência na expressão de três proteases por intermédio de RNAi <i>in planta</i> reduz a taxa de parasitismo</b>	<b>29</b>
<b>Resumo</b>	<b>29</b>
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>30</b>
<b>1.2. OBJETIVOS</b>	
1.2.1. Objetivo geral	<b>34</b>
1.2.2. Objetivos específicos	<b>34</b>
<b>1.3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
1.3.1. Cultura e coleta de <i>Meloidogyne incognita</i>	<b>35</b>
1.3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA de diferentes estágios de vida de <i>M. incognita</i>	<b>36</b>
1.3.3. Quantificação da expressão dos transcritos dos genes <i>Mi-asp-1</i> , <i>Mi-ser-1</i> e <i>Mi-cpl-1</i> em diferentes estágios (ovo, J2 e J4/fêmea) de vida	

de <i>M. incognita</i> por qRT-PCR	36
1.3.4. Seleção dos fragmentos dos genes das proteases de <i>M. incognita</i> para silenciamento gênico	37
1.3.5. Construção dos vetores para silenciamento gênico in planta das proteases de <i>M. incognita</i> .	38
1.3.6. Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> com as construções que expressam dsRNA via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
1.3.7. Seleção das plantas transformadas com as construções para silenciamento gênico das proteases de <i>M. incognita</i>	40
1.3.8. Bioensaios de infecção de <i>M. incognita</i> em eventos de <i>N. tabacum</i> expressando dsRNA e reinfecção em plantas não transformadas	42
1.3.9. RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes das proteases em <i>M. incognita</i> que infectaram eventos de <i>N. tabacum</i> expressando dsRNA.	43
<b>1.4. RESULTADOS</b>	
1.4.1. Seleção dos genes de proteases e quantificação do acúmulo dos transcritos destes genes em diferentes estágios de vida de <i>M. incognita</i>	44
1.4.2. Escolha de regiões específicas para <i>M. incognita</i> de cada gene para silenciamento via RNAi.	46
1.4.3. Subclonagem das regiões selecionadas dos genes das proteases em vetor binário e transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	47
1.4.4. Seleção dos eventos transformados na geração F1 das construções pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl.	48
1.4.5. Bioensaios dos eventos transformados com as construções pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl contra <i>M. incognita</i> .	50
1.4.6. Análise da expressão dos transcritos das proteases Mi-asp-1, Mi-ser-1 e Mi-cpl-1 em ovos e J2 recuperados de plantas transgênicas expressando dsRNA para os genes alvo	54
1.4.7. Análise da virulência dos J2 recuperados dos eventos transgênicos expressando dsRNA para as proteases alvo de RNAi	55

<b>1.5. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
1.5.1. O perfil de expressão das proteases pode dar indícios das suas prováveis funções em <i>M. incognita</i>	<b>58</b>
1.5.2. Os nematoides que infectaram plantas contendo construções para silenciamento das proteases tiveram sua fecundidade e viabilidade dos ovos reduzidos	<b>60</b>
1.5.3. O silenciamento dos genes das proteases passa para a progênie de <i>M. incognita</i> sendo detectado nos ovos, mas não em J2	<b>62</b>
1.5.4. Os efeitos fenotípicos do RNAi em fitonematoides podem se prolongar para geração seguinte mesmo após a reestabilização da expressão dos transcritos	<b>64</b>
1.5.5. O silenciamento de genes simultaneamente pode ser uma estratégia tanto para validação de efeitos sinérgicos e aditivos como para utilizar vários genes alvos eficientes para controle de fitonematoides	<b>65</b>
<b>1.6. CONCLUSÕES</b>	<b>67</b>
<b>1.7. REFERÊNCIAS</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 2:</b> Expressão ectópica de uma proteína de glândula dorsal de <i>Meloidogyne incognita</i> acelera a formação do sítio de alimentação do nematoide	<b>85</b>
<b>Resumo</b>	<b>85</b>
<b>2.1. Introdução</b>	<b>86</b>
<b>2.2. Objetivos</b>	
2.2.1. Objetivo Geral	<b>89</b>
2.2.2. Objetivos específicos	<b>89</b>
<b>2.3. Materiais e Métodos</b>	
2.3.1. Amplificação do gene a partir de cDNA de J4/Fêmea e hibridização <i>in situ</i> do tipo “whole-mount”	<b>90</b>
2.3.2. Clonagem do cDNA 7E12 de <i>M. incognita</i> para expressão em plantas	<b>90</b>
2.3.3. Transformação e seleção das plantas expressando 7E12	<b>91</b>



2.3.4. Inoculação dos nematoides e estudo de infecção	92
2.3.5. Preparo de amostras e análises de microscopia	92
2.3.6. Extração de proteínas e imunodeteção por dot blot	93
2.3.7. Análise estatística	94
<b>2.4. Resultados</b>	
2.4.1. Localização especial do RNA mensageiro do gene <i>7E12</i> por hibridização <i>in situ</i>	95
2.4.2. Análise de DNA e proteína de plantas GM confirmam a presença do gene e da proteína de fusão GFP:7E12	95
2.4.3. Análises macroscópicas e microscópicas do fenótipo das raízes transgênicas	96
<b>2.5. Discussão</b>	99
<b>2.6. Conclusões</b>	103
<b>2.7. Referências</b>	104
<b>VI - CONCLUSÃO GERAL</b>	115
<b>VII - PERSPECTIVAS</b>	117
<b>VIII - ANEXOS</b>	119

## ÍNDICES DE FIGURAS

<b>Figura I.i.</b> O ciclo de vida de <i>Meloidogyne incognita</i>	<b>23</b>
<b>Figura I.ii.</b> Genes de parasitismo (efetores) de fitonematoides	<b>24</b>
<b>Figura I.iii.</b> Distribuição relativa das cinco classes catalíticas das proteases presentes nos genomas dos nematoides <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Meloidogyne hapla</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i> .	<b>25</b>
<b>Figura I.iv.</b> Representação esquemática da rota de exo-RNAi em <i>Caenorhabditis elegans</i>	<b>26</b>
<b>Figura 1.1.</b> Mapas dos vetores utilizados para fazer as construções para silenciamento gênico via RNAi utilizando o sistema Gateway® de clonagem por recombinação	<b>73</b>
<b>Figura 1.2.</b> Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos das proteases <i>Mi-asp-1</i> , <i>Mi-ser-1</i> e <i>Mi-cpl-1</i> em <i>M. incognita</i> em três estágios de vida	<b>74</b>
<b>Figura 1.3.</b> Regiões específicas, de cada gene, selecionadas para serem alvo de silenciamento via RNAi.	<b>75</b>
<b>Figura 1.4.</b> Amplificação e subclonagem dos fragmentos dos genes <i>Mi-asp-1</i> , <i>Mi-ser-1</i> , <i>Mi-cpl-1</i> e da fusão dos três fragmentos juntos.	<b>76</b>
<b>Figura 1.5.</b> Subclonagem dos fragmentos dos genes <i>Mi-asp-1</i> , <i>Mi-ser-1</i> , <i>Mi-cpl-1</i> e da fusão dos três fragmentos juntos no vetor pK7GWIWG2(I) e PCR de colônias de <i>Agrobacterium</i>	<b>77</b>
<b>Figura 1.6.</b> Caracterização das linhagens transgênicas transformadas com a construção contendo os fragmentos das proteases fusionados em sequência	<b>78</b>
<b>Figura 1.7.</b> Caracterização das linhagens transgênicas transformadas com as construções para silenciamento das proteases <i>Mi-ser-1</i> e <i>Mi-cpl-1</i> .	<b>79</b>
<b>Figura 1.8.</b> Exemplo de genotipagem das plantas transformadas com a construção para expressão de dsRNA para as proteases aspártica, serínica e cisteínica fusionadas.	<b>80</b>
<b>Figura 1.9.</b> Exemplo de genotipagem das plantas transformadas com as construções para expressão de dsRNA para as proteases serínica e cisteínica isoladamente.	<b>81</b>
<b>Figura 1.10.</b> Efeito das plantas expressando dsRNA para as construções	

pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl no ciclo de vida de <i>M. incognita</i> .	<b>82</b>
<b>Figura 1.11.</b> Quantificação do acúmulo de transcritos por qRT-PCR das três proteases de ovos e J2 de <i>M. incognita</i> oriundos de eventos RNAi com a construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, e das proteases serínica para a construção pK7GWIWG2(I) – ser e cisteínica para a construção pK7GWIWG2(I) – cpl.	<b>83</b>
<b>Figura 1.12.</b> Experimento de reinfecção dos Juvenis em estágio 2 (J2) oriundos de eventos transgênicos que expressavam dsRNA para as três proteases simultaneamente, e para as proteases serínica e cisteínica separadamente, em plantas não transgênicas.	<b>84</b>
<b>Figura 2.1.</b> Cassete de expressão mostrando o promotor CaMV 35S seguido pelo gene da Proteína Fluorescente Verde (GFP) fusionado a 7E12 de glândula esofágica de <i>Meloidogyne incognita</i> .	<b>107</b>
<b>Figura 2.2.</b> Localização <i>in situ</i> do RNAm de 7E12 em células da glândula esofágica dorsal de fêmeas adultas de <i>Meloidogyne incognita</i> .	<b>108</b>
<b>Figura 2.3.</b> Detecção dos fragmentos do gene 7E12 e da fusão gfp:7E12, por PCR, nos eventos transformados.	<b>109</b>
<b>Figura 2.4.</b> “Dot blot” usando o anticorpo marcador fluorescente anti-GFP.	<b>110</b>
<b>Figura 2.5.</b> Raízes de <i>Nicotiana tabacum</i> inoculadas com segundo estágio juvenil (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> .	<b>111</b>
<b>Figura 2.6.</b> Número de galhas a oito, 16 e 28 DAI.	<b>112</b>
<b>Figura 2.7.</b> Imagens de campo claro de células gigantes após coloração com azul de toluidina de galhas de raízes de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> controle e transformadas com 7E12, oito DAI com <i>Meloidogyne incognita</i> .	<b>113</b>
<b>Figura 2.8.</b> Avaliação da eclosão de J2 de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> controle e transformadas, 45 DAI.	<b>114</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I.i.</b> Sumário das principais características das prováveis proteases anotadas a partir do genoma de <i>M. incognita</i> .	<b>21</b>
<b>Tabela I.ii.</b> Genes-alvo de fitonematoides controlados efetivamente por RNAi.	<b>22</b>
<b>Tabela 1.1.</b> Lista de oligonucleotídeos utilizados no capítulo 1.	<b>72</b>

## ABREVIATURAS

<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dsRNA</b>	RNA fita dupla
<b>EST</b>	“expressed sequence tag”, etiquetas de transcritos
<b>GM</b>	(planta) geneticamente modificada
<b>kb</b>	Quilobase - $10^3$ pares de bases
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>NCBI</b>	“national center for biotechnology information”
<b>NFC</b>	Nematoide formador de cisto, <i>Heterodera</i> e <i>Globodera</i> spp.
<b>NFG</b>	Nematoide formador de galhas, <i>Meloidogyne</i> spp.
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação de polimerização em cadeia (“polymerase chain reaction”)
<b>RACE</b>	“rapid amplification of cDNA ends”
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNA<sub>i</sub></b>	RNA interferente
<b>rRNA</b>	RNA ribossomal
<b>RT</b>	“reverse transcriptase”, transcriptase reversa
<b>RT-PCR</b>	Transcrição reversa seguida de PCR
<b>qRT-PCR</b>	RT-PCR quantitativa (em tempo real)
<b>siRNA</b>	RNA interferente pequeno

## RESUMO GERAL

O nematoide formador de galhas *Meloidogyne incognita* está presente em quase todos os continentes, causando prejuízos em várias culturas importantes. Proteínas da glândula esofagiana de *Meloidogyne* spp. podem desenvolver funções importantes no estabelecimento de sítios de alimentação funcionais do nematoide. A função precisa destas proteínas no processo de desenvolvimento do sítio de alimentação é desconhecida. Além disso, estudos sugerem que as proteases do nematoide também estejam envolvidas neste processo de estabelecimento do sítio de alimentação, tornando estas enzimas proteolíticas alvos interessantes para estudos de intervenção de expressão. No primeiro capítulo foi feita a intervenção da expressão das proteínas por intermédio de RNA interferente de três genes (*Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1*) de proteases de classes catalíticas diferentes, para entender melhor a função das mesmas na interação do nematoide com o hospedeiro. Observou-se uma diminuição da taxa de fecundidade nos nematoides que infectaram as plantas GM. Além disso, a progênie apresentou menor taxa de eclosão de J2 e de infecção do hospedeiro. No segundo capítulo, a proteína 7E12 de *M. incognita*, que é produzida na glândula dorsal e secretada dentro da planta durante o parasitismo, foi super expressa em plantas de tabaco para o conhecimento da função desta proteína. A partir dos resultados obtidos foi possível sugerir que a presença da proteína 7E12 na planta de tabaco acelerou a formação das galhas de *M. incognita*, indicando uma possível função desta proteína na iniciação e/ou na manutenção do sítio de alimentação. O estudo destas moléculas efetoras de parasitismo é um passo chave para compreender melhor as relações entre o hospedeiro e o parasita. A compreensão destas interações possibilitará o desenvolvimento de novas ferramentas para o controle de *M. incognita*.

## SUMMARY

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is present in almost all continents, causing serious damage in many important crops. Some reports indicate that proteins produced by its dorsal gland perform important roles in the establishment of a functional nematode feeding site. The precise role of these proteins in the development of these feeding sites is still unknown. However, previous studies suggest that nematode proteases are involved in the establishment of feeding sites, turning them into interesting targets for expression intervention studies. In the first chapter, in order to understand the function of these enzymes in the interaction between the nematode and its host, the protein expression of three genes (*Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* and *Mi-cpl-1*) representing different catalytic classes of proteases was reduced by RNA interfering (RNAi). I found that the nematodes that infect GM plants had their fertility rate reduced. In addition, the progeny show reduced hatching rate and host infection. In the second chapter, the protein 7E12 of *M. incognita*, which is produced in the dorsal gland and secreted into the host during parasitism, was overexpressed in tobacco plants in order to address the function of this protein. The results obtained in this study suggest that the presence of this protein in tobacco plants accelerated the formation of *M. incognita* galls, indicating a possible function of this protein in the initiation and/or maintenance of feeding sites. The study of these parasitism effector molecules is a key step to better understand the relationship between host and parasite. I envisage that the understanding of these interactions will help the development of new tools for *M. incognita* control.

# I – INTRODUÇÃO

## I.i. Introdução Geral

Em países denominados emergentes, como o Brasil, a agricultura é um dos principais pilares da economia. No Brasil, as principais culturas produzidas são: soja, algodão, milho, feijão, café, cana-de-açúcar, entre outras [1]. Estas e outras culturas possuem importância sócio-econômica relevantes, contribuindo com cerca de 25% do PIB na última década com, tendências de aumento cada vez mais significativo [2], além da geração direta e indireta de empregos, seja na cadeia de produção ou em produtos derivados [3].

No entanto, a maioria destas culturas é plantada em grandes áreas em monocultivo, sendo a produção prejudicada pela incidência de pragas e doenças. Os principais agentes causadores de danos são insetos, nematoides, fungos, bactérias e vírus. Dentre estes, um dos grupos mais problemáticos no mundo, atualmente, são os fitonematoides, causando perdas mundiais da ordem de 125 bilhões de dólares por ano [4]. Os principais nematoides fitoparasitas são os formadores de galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.) e os de cisto (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) [5].

A principal forma de controle de fitonematoides atualmente é a utilização de nematicidas sintéticos (químicos) que são bastante danosos ao meio ambiente, possuindo em sua composição compostos de alta toxicidade, contaminando o solo, corpos aquáticos, além dos efeitos residuais para outras formas de vida, incluindo os mamíferos [6]. Além disso, possuem um alto custo e sua eficiência é comprometida, uma vez que os fitonematoides endoparasitas apresentam comportamento endógeno, ficando protegidos no interior das raízes das plantas durante a maior parte do seu ciclo de vida dificultando a ação da maioria dos nematicidas (Figura I.i)



[7]. Outra forma de controle que vem sendo explorada é a utilização de variedades que possuem genes de resistência naturais (Nem R), porém a avaliação destas cultivares mostra apenas resistência específica a determinadas raças ou patótipos de fitonematoides [7]. Métodos de controle cultural, como a rotação de culturas, não têm demonstrado resultados satisfatórios devido ao uso indevido do solo, do aumento da área envolvida na produção, e devido ao hábito polífago de alguns nematoides, especialmente espécies apomíticas como *M. incognita* e *M. javanica*, além do menor retorno financeiro ao produtor [7-9].

Devido a estes problemas, faz-se necessário entender melhor o processo de parasitismo destes nematoides, com o intuito de se buscar alternativas de controle mais viáveis, que sejam menos onerosas para o produtor e danosas ao ambiente.

A prospecção de novos genes, proteínas e metabólitos secundários com efeito nematicida, aliados a produção de plantas geneticamente modificadas (GM), surgem, portanto, como uma estratégia promissora para o controle de fitonematoides em diversas etapas do ciclo de vida destes parasitas.

#### **I.ii. Biologia do fitonematoide endoparasita sedentário *Meloidogyne incognita***

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, ou nematoides das galhas radiculares, são considerados os mais prejudiciais para a economia agrícola mundial, causando cerca de 80% das perdas [10] sendo que *M. incognita* é uma das espécies que mais causam danos, principalmente por possuir hábito polífago, infectando mais de 2000 espécies de plantas [7].

A reprodução deste organismo ocorre por meio de partenogênese mitótica, com um ciclo de vida variando, em média, de seis a oito semanas. Depois da

maturação, as fêmeas depositam seus ovos em matriz gelatinosa do lado de fora da raiz. Juvenis de segundo estágio (J2) eclodem dos ovos no solo e invadem os tecidos da raiz próximo a coifa, migrando intercelularmente em direção ao cilindro vascular. Os J2 após a penetração na raiz, a partir do córtex da planta para a ponta da raiz, entram na base do cilindro vascular migrando raiz acima [5]. Se a situação do parasitismo estiver favorável, eles se diferenciam em fêmeas que adquirem formato de pera, tornando-se sedentárias, e se alimentam do conteúdo citoplasmático das células gigantes multinucleadas que começaram a ser induzidas quando o nematoide ainda estava no estágio J2 (Figura I.i). Células gigantes são sítios de alimentação permanentes na zona de diferenciação da raiz formados por meio da indução da divisão nuclear com a supressão da citocinese nas células hospedeiras. As células vizinhas às células gigantes sofrem hiperplasia e hipertrofia, causando a formação das galhas, principal sintoma deste parasita [11]. Os machos permanecem vermiformes e deixam a raiz [12, 13].

### **I.iii. Efeitores de parasitismo de fitonematoides**

Os efetores de parasitismo de fitonematoides consistem de proteínas e outras moléculas secretadas que, combinadas com a ação mecânica do estilete, promovem a penetração e migração do nematoide na raiz da planta. Além disso, os efetores têm papel na prevenção e na regulação de mecanismos de defesa da planta, e para iniciar ou manter o desenvolvimento dos sítios de alimentação [14]. A maioria desses efetores é produzida nas glândulas esofágicas (subventral e dorsal) e liberada no citoplasma da célula vegetal por meio do estilete, um órgão retrátil em forma de lança oca, que compõe a boca do nematoide [15] (Figura I.ii).

O primeiro gene envolvido no parasitismo de fitonematoides identificado foi o de  $\beta$ -1,4-endoglucanase sintetizada nas células das glândulas subventrais dos nematoides de cisto *Globodera rostochiensis* e *Heterodera glycines* [16].  $\beta$ -1,4-endoglucanases são expressas durante a penetração e migração desses nematoides nas raízes [17, 18]. Para penetração e migração nas raízes, os nematoides possuem um arsenal de enzimas hidrolíticas para digestão dos polímeros da parede celular, como pectato liases e poligalacturonases que degradam polissacarídeos de pectina [19, 20], enzimas que degradam celulose (endoglucanases) [21, 22], hemicelulose (xilanases) [23] e expansinas [24].

Outras proteínas têm sido caracterizadas como efetoras potencialmente envolvidas na formação e manutenção dos sítios de alimentação de nematoides. Dentre estas, destaca-se a enzima corismato mutase (CM) de *M. javanica* que, quando expressa em raízes de soja, afeta a diferenciação do tecido vascular [25], provocando a redução dos níveis do hormônio vegetal ácido indol-3-acético (AIA), o que resulta na rediferenciação celular e formação de células gigantes [26]. Outras proteínas que podem estar relacionadas com o controle dos processos celulares do hospedeiro durante a formação do sítio de alimentação foram detectadas em *Heterodera glycines*, sendo elas a proteína associada à quinase da fase S 1 (Skp-1), proteínas dedo de zinco tipo RING-H2, e uma proteína de extensão de ubiquitina [27]. Mais de 25% das proteínas de parasitismo de nematoides deduzidas possuem sinais de localização nuclear (SLN), alguns dos quais contêm motivos de ligação a DNA, sugerindo que parte dos produtos de secreção do nematoide, uma vez atingindo o citoplasma da célula vegetal, seria direcionada para o núcleo, onde interagiriam diretamente na regulação da expressão de genes que estariam envolvidos na formação do sítio de alimentação [28].

Um esforço considerável tem sido realizado para a identificação das moléculas efetoras de parasitismo. Gao e colaboradores [29] e Huang e colaboradores [30] desenvolveram respectivamente, para *H. glycines* e *M. incognita* bibliotecas de cDNA de glândulas esofágicas para identificar potenciais moléculas efetoras. Entretanto, grande parte dessas moléculas não tinha qualquer semelhança com outras moléculas já descritas na literatura, tendo sido definidas como pioneiras.

Recentemente, algumas funções de moléculas secretadas por nematoides formadores de cisto e produzidas nas glândulas esofágicas foram desvendadas. Uma proteína de ligação à celulose de *Heterodera schachtii* (Hs-CBP) foi estudada por Hewezi e colaboradores [31]. Os autores relataram que essa proteína que é expressa em estágios iniciais da formação do sítio de alimentação (sincício), interagiu forte e especificamente com a proteína pectina metil esterase 3 (PME3) de *Arabidopsis thaliana*. Estudos de localização mostraram que a PME 3 funciona como uma enzima modificadora de parede celular, indicando que Hs-CBP interage com PME3 ativando e potencializando a ação da mesma, ajudando no parasitismo do nematoide.

Já em estudo realizado por Patel e colaboradores [32] foi identificado que a proteína Hs4F01, secretada da glândula de *H. schachtii*, pertence à família das anexina, que se ligam a cálcio e fosfolipídeos. Essa proteína possui uma identidade de 33% à anexina-1 (*AnnAt1*) de *A. thaliana*. Ensaio de complementação de *AnnAt1* mutantes com a expressão constitutiva Hs4F01 reverteu a sensibilidade do mutante a NaCl 75 mM. Além disso, a expressão constitutiva da Hs4F01 em *A. thaliana* selvagem aumentou a susceptibilidade das plantas *H. schachtii* e, em ensaios de RNA interferente com a planta expressando dsRNA complementar ao Hs4F01, reduziu o nível de infecção dos nematoides. Estes resultados indicam que,

provavelmente, o efetor Hs4F01 na célula hospedeira pode mimetizar a função da anexina da planta, durante o parasitismo.

A proteína 16D10, expressa na glândula dorsal de *M. incognita* e secretada no hospedeiro, foi caracterizada por Huang e colaboradores [33]. Essa proteína quando foi expressa constitutivamente em *A. thaliana* estimulou o crescimento das raízes. Além disso, em ensaios de duplo híbrido de levedura (“yeast two-hybrid” – Y2H) e de co-imunoprecipitação (Co-IP) foram identificados dois fatores de transcrição do tipo SCARECROW da família de proteínas GRAS como potenciais alvos de ligação da proteína 16D10. Estes dados confirmaram pela primeira vez que os efetores de nematoides interagem com as proteínas das plantas para estabelecimento do seu parasitismo.

Esses dados, em conjunto, confirmam a hipótese de que as alterações na expressão gênica em células hospedeiras, durante o estabelecimento do parasitismo por fitonematoides, são provocadas pelos sinais oriundos do nematoide. Esses sinais são suficientes para afetar a maquinaria de expressão gênica nas células hospedeiras que subsequentemente mediam o fenótipo dos sítios de alimentação [34].

#### **I.iv. Degradoma de *Meloidogyne incognita***

Dentre as diversas proteínas secretadas por nematoides durante a o seu processo de infecção, destacam-se as proteases, responsáveis por diversos tipos de função metabólica envolvendo a degradação de polipeptídeos.

O “degradoma” é definido como o conjunto completo de proteases presentes em um organismo [35]. Em parasitas helmínticos, tais como fitonematoides, são

encontradas todas as classes de proteases descritas na literatura: cisteínicas, serínicas, aspárticas, treonínicas e metaloproteases. As proteases são classificadas conforme o mecanismo de hidrólise da ligação peptídica, pelos resíduos catalíticos, especificidade de substratos e sequência de aminoácidos.

Várias funções têm sido sugeridas para proteases no mecanismo de parasitismo, incluindo invasão de tecidos, evasão do sistema imune, além da digestão de proteínas do hospedeiro pelo parasita [36].

Anteriormente, acreditava-se que as proteases do tipo metaloproteases e aspárticas estavam mais evidentes em endoparasitas de animais enquanto as do tipo serínicas e cisteínicas estavam em maior evidência no trato intestinal de fitonematoides [37]. Até recentemente havia, na literatura, poucos dados a respeito de proteases digestivas de *M. incognita*, sendo descritas apenas as clonagens e/ou caracterização de duas proteases aspárticas [38, 39], uma serínica [40], e duas cisteínicas [41, 42]. No entanto, desde a disponibilização do genoma de *M. incognita* em 2008 [13], sabe-se que o nematoide das galhas possui genes de todos os tipos de proteases (Tabela I.i) [43], ampliando muito as prováveis funções dessas enzimas, e abrindo espaço para diversos estudos.

De acordo com o trabalho de Castagnone-Sereno e colaboradores [43], que comparou globalmente as proteases de *M. incognita*, *M. hapla* e *C. elegans*, foi verificado que o número de proteases é variável, entretanto as proporções de cada classe catalítica são aproximadamente as mesmas. Todavia, foi observado um aumento no número de proteases cisteínicas e uma diminuição de metalo proteases em *M. incognita* quando se compara com *C. elegans* (Figura I.iii). Outro dado interessante é que, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, *M. incognita* e *M. hapla* possuem além de número de proteases diferentes, com *M. incognita*

possuindo quase o dobro, as proporções das classes catalíticas são ligeiramente distintas, com a diferença mais significativa nas proteases aspárticas, sendo que *M. incognita* possui mais que o dobro das proteases de *M. hapla* (Figura I.iii). Os motivos pelos quais se observam esses tipos de comportamento na presença e nas proporções dessas proteases ainda são desconhecidos. No entanto a diferença de número de proteases totais entre *M. incognita* e *M. hapla*, pode ser explicada pela história evolutiva dessas espécies, onde *M. incognita* é um híbrido (3n) e *M. hapla* é diploide [44]. Portanto, as proteases podem ser um alvo interessante na intervenção do parasitismo de nematoides, porque desempenham papel fundamental em vários processos metabólicos e na interação parasita-hospedeiro [45].

A utilização dessas proteases no controle de fitonematoides pode ser feita utilizando fatores antinutricionais que atuam inibindo proteínas digestivas do parasita. A primeira indicação de que fitonematoides poderiam ser controlados pelo bloqueio de uma protease digestiva foi obtida quando um inibidor de tripsina de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) expresso em batata GM, mostrou ter influência negativa no sucesso reprodutivo de *Globodera pallida* [46]. Além disso, o acúmulo de inibidores de serino proteases, detectado em órgãos subterrâneos de solanáceas, pode contribuir para a defesa da planta contra nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) [7].

Outra técnica denominada RNA interferente, também foi utilizada para diminuir a expressão de proteases de fitonematoides. Urwin e colaboradores [47] conseguiram uma redução significativa de uma protease cisteínica de *H. glycines* e *G. pallida*, resultando em um menor número de fêmeas. Já Shingles e colaboradores [42] utilizaram esta técnica para reduzir a expressão de uma catepsina L de *M. incognita*

que resultou na diminuição do número de nematoides capazes de infectarem plantas de tomate.

#### **I.v. RNA interferente (RNAi)**

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um fenômeno que ocorre naturalmente na células de diversos organismos do domínio Eukarya, e consiste do silenciamento pós-transcricional de genes específicos por intermédio de moléculas RNA dupla-fita (dsRNA) [48]. Esse processo foi primeiramente descrito em plantas e foi denominado silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) e foi associado a um sistema de defesa contra efeitos da movimentação de transposons e contra infecção por vírus [49, 50] e, em seguida, foi também relacionado a um mecanismo de regulação de expressão de genes [51]. Entretanto, a primeira descrição de RNAi em animais foi descrita em 1998 por Fire e colaboradores [52] onde este processo teve uma melhor compreensão no organismo modelo *C. elegans*, um nematoide de vida livre, o que rendeu aos autores Fire e Mello o Premio Nobel de Fisiologia/Medicina em 2006.

A via de RNAi apresenta um processamento inicial comum que se desdobra em quatro etapas funcionais [9] (Figura I.iv). Quando um dsRNA é introduzido na célula, este é reconhecido pela DICER, que cliva a molécula em um processo dependente de ATP, em uma série de “duplexes” de 21-23 pb [53] que apresentam 2 nucleotídeos livres nas extremidades 3'. Esses pequenos “duplexes” são chamados de siRNA (“small interfering RNA”), e podem ser transmitidos sistematicamente pela interação com a proteína SID. Os siRNA se ligam ao complexo enzimático RISC, e em outro passo dependente de ATP, o “duplex” é separado e uma das fita simples continua ligada no RISC, resultando na sua ativação. Nesse estágio, a liberação do



siRNA fita-simples pode resultar na amplificação do efeito do RNAi. O complexo RISC ativado quando encontra um RNAm homólogo se liga por complementaridade de bases e cliva o RNAm em aproximadamente 12 nucleotídeos a partir da extremidade 3' do siRNA, culminando na degradação do RNAm. Em *C. elegans* existe um passo de amplificação que é conduzida pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). Neste processo, moléculas de siRNA fita-simples derivadas de dsRNAs dissociados ou liberadas a partir do complexo RISC ativado, atuam como oligonucleotídeos no RNAm complementar resultando na produção de novas moléculas de dsRNA, que se tornam substratos para a DICER.

O RNAi como ferramenta biotecnológica vem sendo utilizado consistentemente no silenciamento da expressão de genes específicos [9, 47, 52, 54-61]. Com essa técnica, pode-se estudar a função específica de um gene e seus efeitos potenciais no parasitismo de diversos sistemas biológicos, inclusive fitonematoides. Em *C. elegans*, foi demonstrado em estudos independentes que o silenciamento de genes específicos por RNAi pode ser efetuado de diferentes formas: por alimentação dos nematoides com bactérias que expressam um dsRNA complementar a um gene presente no organismo [55], pela microinjeção de dsRNA no corpo do nematoide [62], e pela ingestão de dsRNA pelo método “soaking” [54]. O entendimento dos processos enzimáticos desse fenômeno biológico resultou no desenvolvimento de uma poderosa ferramenta para a genômica funcional.

## **I.vi. O uso de RNA interferente (RNAi) como estratégia na genômica funcional e estratégia de controle de fitonematoides**

As aplicações de RNAi na genômica funcional têm sido feitas, principalmente, em organismos modelos como o nematoide *C. elegans* e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* [52, 57].

Utilizando o mecanismo de ingestão oral de dsRNA de *C. elegans* em nematoides parasitas de plantas foi obtido o silenciamento de diversos genes envolvidos com o parasitismo (revisado em [63]). Em nematoides parasitas de plantas, no entanto, para a ingestão de dsRNA é necessário a utilização de substâncias estimulantes neuroativas (octopamina ou resorcinol) na solução de “soaking”, uma vez que os fitonematoides naturalmente não se alimentam até que tenham penetrado na planta [8]. Vários genes de parasitismo de fitonematóides tiveram sua função determinada e/ou confirmada por essa técnica, apresentando resultados com distintos fenótipos, em diferentes etapas do ciclo de vida do nematoide (Tabela I.ii).

O silenciamento dos genes de calreticulina e poligalacturoanse de *M. incognita* que são expressos nas glândulas subventrais, por meio do método de “soaking”, resultou na redução de transcritos visualizada por hibridização *in situ* [58]. Porém, o efeito do silenciamento foi curto (< 72 horas) quando comparado com o silenciamento do gene da principal proteína do esperma (MSP) de J2 do nematoide do cisto (*H. glycines*), que foi de 14 dias [47]. Esta variabilidade na eficiência do RNAi utilizando o método de “soaking” (*in vitro*) pode ser atribuída a variabilidade existente nos níveis de transcritos de cada gene em diferentes estágios do ciclo de vida do nematoide [64].

Outro método utilizado para validação de genes é o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), utilizado com sucesso em folhas para obter respostas de plantas a patógenos [65, 66] e também testado como método de validação “high-throughput” de genes de *M. incognita* [67].

Entretanto, RNAi produzido pela planta hospedeira utilizando vetores desenhados para expressar dsRNA em plantas transformadas [56] pode ser um método eficaz para a administração de dsRNA nos estágios onde os genes alvos do nematoide não são expressos. A expressão de RNA dupla fita em células de plantas mostra-se compatível com o hábito sedentário dos principais nematoides endofíticos, uma vez que desenvolvem, em seus hospedeiros, sítios de alimentação e durante o estágio adulto utilizam material citoplasmático como fonte de nutrientes [27] e desta forma constantemente ingerindo o dsRNA e/ou siRNA, ao longo de sua fase endofítica.

Os primeiros trabalhos com RNAi *in planta* foram os de Yadav e colaboradores [59] e Huang e colaboradores [68], nos quais os primeiros obtiveram plantas de tabaco transgênicas expressando dsRNA contra um gene específico de *M. incognita*, envolvido no processamento de RNAm (fator de “splicing”). De 25 plantas transgênicas obtidas somente 2 formaram galhas, enquanto as outras 23 demonstraram resistência completa. Utilizando estratégia semelhante, Huang e colaboradores [68] desenvolveram plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando o gene *16D10* de *M. incognita*, o qual atua estimulando o crescimento das raízes. A expressão de dsRNA contra transcritos do *16D10* conferiu alta resistência em plantas de *A. thaliana* contra as principais espécies de nematoides das galhas (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* e *M. arenaria*), indicando ser um gene conservado e essencial para o processo de parasitismo. Outros grupos de pesquisa obtiveram

resultados significativos *in planta* (Tabela I.ii), valendo destacar uma nova estratégia de silenciamento que usa plantas quiméricas de soja, nas quais a parte aérea não é transgênica, e as raízes são transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* [69].

A eficiência da estratégia de RNAi *in planta* em alguns casos é muito alta e isto implica que alguns destes genes são essenciais para o desenvolvimento do nematoide. Esses resultados confirmam a hipótese de que dsRNA liberado *in planta* é um método viável para o estudo funcional de genes candidatos ao parasitismo de *M. incognita*, além de poder ser utilizado como ferramenta de controle em plantas comerciais geneticamente modificadas.

## I.vii. Referências

- [1] E. Contini, J.G. Gasques, R.B.A. Leonardi, E.T. Bastos, Evolução recente e tendências do agronegócio, *Revista de Política Agrícola*, 15 (2006) 5-28.
- [2] E. Contini, J.G. Gasques, R.B.A. Leonardi, E.T. Bastos, Projeções do agronegócio no Brasil, *Revista de Política Agrícola*, 15 (2006) 57-81.
- [3] S.O.C. Avellar, P.S. Vilela, Evolução do número de pessoas ocupadas na agropecuária brasileira no período de 1990 a 2004., *Revista de Política Agrícola*, 15 (2006) 9-16.
- [4] D.J. Chitwood, Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, *Pest Manag Sci*, 59 (2003) 748-753.
- [5] V.M. Williamson, C.A. Gleason, Plant–nematode interactions, *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (2003) 327-333.
- [6] L.G. Freitas, R.D.L. Oliveira, S. Ferraz, *Introdução à Nematologia*, Editora UFV, Viçosa, MG, 2001.
- [7] D.L. Trudgill, V.C. Blok, Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens, *Annu Rev Phytopathol*, 39 (2001) 53-77.
- [8] H.J. Atkinson, P.E. Urwin, M.J. McPherson, Engineering plants for nematode resistance, *Annu Rev Phytopathol*, 41 (2003) 615-639.
- [9] M. Bakhetia, W.L. Charlton, P.E. Urwin, M.J. McPherson, H.J. Atkinson, RNA interference and plant parasitic nematodes, *Trends Plant Sci*, 10 (2005) 362-367.
- [10] V.M. Williamson, A. Kumar, Nematode resistance in plants: the battle underground, *Trends Genet*, 22 (2006) 396-403.
- [11] V.M. Williamson, R.S. Hussey, Nematode pathogenesis and resistance in plants, *Plant Cell*, 8 (1996) 1735-1745.
- [12] R.H. Curtis, Plant parasitic nematode proteins and the host parasite interaction, *Brief Funct Genomic Proteomic*, 6 (2007) 50-58.
- [13] P. Abad, J. Gouzy, J.M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E.G. Danchin, E. Deleury, L. Perfus-Barbeoch, V. Anthouard, F. Artiguenave, V.C. Blok, M.C. Caillaud, P.M. Coutinho, C. Dasilva, F. De Luca, F. Deau, M. Esquibet, T. Flutre, J.V. Goldstone, N. Hamamouch, T. Hewezi, O. Jaillon, C. Jubin, P. Leonetti, M. Magliano, T.R. Maier, G.V. Markov, P. McVeigh, G. Pesole, J. Poulain, M. Robinson-Rechavi, E. Sallet, B. Segurens, D. Steinbach, T. Tytgat, E. Ugarte, C. van Ghelder, P. Veronico, T.J. Baum, M. Blaxter, T. Bleve-Zacheo, E.L. Davis, J.J. Ewbank, B. Favery, E. Grenier, B. Henrissat, J.T. Jones, V. Laudet, A.G. Maule, H. Quesneville, M.N. Rosso, T. Schiex, G. Smant, J. Weissenbach, P. Wincker, Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Nat Biotechnol*, 26 (2008) 909-915.

- [14] G. Gheysen, M.G. Mitchum, How nematodes manipulate plant development pathways for infection, *Curr Opin Plant Biol*, (2011).
- [15] E.L. Davis, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, T.J. Baum, Parasitism proteins in nematode-plant interactions, *Curr Opin Plant Biol*, 11 (2008) 360-366.
- [16] G. Smant, J.P. Stokkermans, Y. Yan, J.M. de Boer, T.J. Baum, X. Wang, R.S. Hussey, F.J. Gommers, B. Henrissat, E.L. Davis, J. Helder, A. Schots, J. Bakker, Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 4906-4911.
- [17] X. Wang, D. Meyers, Y. Yan, T. Baum, G. Smant, R. Hussey, E. Davis, In planta localization of a beta-1,4-endoglucanase secreted by *Heterodera glycines*, *Mol Plant Microbe Interact*, 12 (1999) 64-67.
- [18] M. Goellner, X. Wang, E.L. Davis, Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions, *Plant Cell*, 13 (2001) 2241-2255.
- [19] H. Popeijus, H. Overmars, J. Jones, V. Blok, A. Goverse, J. Helder, A. Schots, J. Bakker, G. Smant, Degradation of plant cell walls by a nematode, *Nature*, 406 (2000) 36-37.
- [20] S. Jaubert, J.B. Laffaire, P. Abad, M.N. Rosso, A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *FEBS Lett*, 522 (2002) 109-112.
- [21] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, Identification of a New ss-1,4-endoglucanase Gene Expressed in the Esophageal Subventral Gland Cells of *Heterodera glycines*, *J Nematol*, 34 (2002) 12-15.
- [22] M.N. Rosso, B. Favery, C. Piotte, L. Arthaud, J.M. De Boer, R.S. Hussey, J. Bakker, T.J. Baum, P. Abad, Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism, *Mol Plant Microbe Interact*, 12 (1999) 585-591.
- [23] M. Mitreva-Dautova, E. Roze, H. Overmars, L. de Graaff, A. Schots, J. Helder, A. Goverse, J. Bakker, G. Smant, A symbiont-independent endo-1,4-beta-xylanase from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (2006) 521-529.
- [24] L. Qin, U. Kudla, E.H. Roze, A. Goverse, H. Popeijus, J. Nieuwland, H. Overmars, J.T. Jones, A. Schots, G. Smant, J. Bakker, J. Helder, Plant degradation: a nematode expansin acting on plants, *Nature*, 427 (2004) 30.
- [25] E.A. Doyle, K.N. Lambert, *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development, *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (2003) 123-131.
- [26] E.L. Davis, M.G. Mitchum, Nematodes. Sophisticated parasites of legumes, *Plant Physiol*, 137 (2005) 1182-1188.

- [27] E.L. Davis, R.S. Hussey, T.J. Baum, Getting to the roots of parasitism by nematodes, *Trends Parasitol*, 20 (2004) 134-141.
- [28] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*, *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (2003) 720-726.
- [29] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*., *Mol Plant Microb Interact*, 14 (2001) 1247-1254.
- [30] G. Huang, B. Gao, T. Maier, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (2003) 376-381.
- [31] T. Hewezi, P. Howe, T.R. Maier, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, E.L. Davis, T.J. Baum, Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with *Arabidopsis* pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism, *Plant Cell*, 20 (2008) 3080-3093.
- [32] N. Patel, N. Hamamouch, C. Li, T. Hewezi, R.S. Hussey, T.J. Baum, M.G. Mitchum, E.L. Davis, A nematode effector protein similar to annexins in host plants, *J Exp Bot*, 61 (2010) 235-248.
- [33] G. Huang, R. Dong, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor, *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (2006) 463-470.
- [34] E.L. Davis, R.S. Hussey, T.J. Baum, J. Bakker, A. Schots, M.N. Rosso, P. Abad, Nematode Parasitism Genes, *Annu Rev Phytopathol*, 38 (2000) 365-396.
- [35] C. Lopez-Otin, C.M. Overall, Protease degradomics: a new challenge for proteomics, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (2002) 509-519.
- [36] G.H. Coombs, J.C. Mottram, Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation, *Parasitology*, 114 Suppl (1997) S61-80.
- [37] C.J. Lilley, P. Devlin, P.E. Urwin, H.J. Atkinson, Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants, *Parasitol Today*, 15 (1999) 414-417.
- [38] R.R. Fragoso, I.T. Lourenco, J.A. Batista, O.B. Oliveira-Neto, M.C. Silva, T.L. Rocha, M.V. Coutinho, M.F. Grossi-de-Sa, *Meloidogyne incognita*: molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase, *Exp Parasitol*, 121 (2009) 115-123.
- [39] P. Vieira, E.G. Danchin, C. Neveu, C. Crozat, S. Jaubert, R.S. Hussey, G. Engler, P. Abad, J. de Almeida-Engler, P. Castagnone-Sereno, M.N. Rosso, The plant apoplasm is an important recipient compartment for nematode secreted proteins, *J Exp Bot*, 62 (2011) 1241-1253.

- [40] R.R. Fragoso, J.A. Batista, O.B. Neto, M.F. Grossi de Sa, Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *Exp Parasitol*, 110 (2005) 123-133.
- [41] C. Neveu, P. Abad, P. Castagnone-Sereno, Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63 (2003) 159-165.
- [42] J. Shingles, C.J. Lilley, H.J. Atkinson, P.E. Urwin, *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi, *Exp Parasitol*, 115 (2007) 114-120.
- [43] P. Castagnone-Sereno, E. Deleury, E.G. Danchin, L. Perfus-Barbeoch, P. Abad, Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes, *Genomics*, 97 (2011) 29-36.
- [44] D.M. Bird, V.M. Williamson, P. Abad, J. McCarter, E.G. Danchin, P. Castagnone-Sereno, C.H. Opperman, The Genomes of Root-Knot Nematodes, *Annual Review of Phytopathology*, 47 (2009) 333-351.
- [45] R.J. Beynon, J.S. Bond, *Proteolytic enzymes: a practical approach*, IRL Press, Oxford university Press Molecular, 1994.
- [46] C.J. Lilley, P.E. Urwin, H.J. Atkinson, Characterization of plant nematode genes: identifying targets for a transgenic defence, *Parasitology*, 118 Suppl (1999) S63-72.
- [47] P.E. Urwin, C.J. Lilley, H.J. Atkinson, Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference, *Mol Plant Microbe Interact*, 15 (2002) 747-752.
- [48] P.A. Sharp, RNAi and double-strand RNA, *Genes Dev*, 13 (1999) 139-141.
- [49] O. Voinnet, RNA silencing as a plant immune system against viruses, *Trends Genet*, 17 (2001) 449-459.
- [50] P.M. Waterhouse, M.B. Wang, T. Lough, Gene silencing as an adaptive defence against viruses, *Nature*, 411 (2001) 834-842.
- [51] G.B. Ruvkun, The tiny RNA world, *Harvey Lect*, 99 (2003) 1-21.
- [52] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391 (1998) 806-811.
- [53] S.M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes Dev*, 15 (2001) 188-200.
- [54] H. Tabara, A. Grishok, C.C. Mello, RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence, *Science*, 282 (1998) 430-431.



- [55] L. Timmons, D.L. Court, A. Fire, Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*, *Gene*, 263 (2001) 103-112.
- [56] S.V. Wesley, C.A. Helliwell, N.A. Smith, M.B. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green, P.M. Waterhouse, Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants, *Plant J*, 27 (2001) 581-590.
- [57] S. Dzitoyeva, N. Dimitrijevic, H. Manev, Identification of a novel *Drosophila* gene, *beltless*, using injectable embryonic and adult RNA interference (RNAi), *BMC Genomics*, 4 (2003) 33.
- [58] M.N. Rosso, M.P. Dubrana, N. Cimbolini, S. Jaubert, P. Abad, Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins, *Mol Plant Microbe Interact*, 18 (2005) 615-620.
- [59] B.C. Yadav, K. Veluthambi, K. Subramaniam, Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection, *Mol Biochem Parasitol*, 148 (2006) 219-222.
- [60] R.M. Steeves, T.C. Todd, J.S. Essig, H.N. Trick, Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction, *Functional Plant Biology*, 33 (2006) 991-999.
- [61] G. Gheysen, B. Vanholme, RNAi from plants to nematodes, *Trends Biotechnol*, 25 (2007) 89-92.
- [62] C.C. Mello, D. Conte, Jr., Revealing the world of RNA interference, *Nature*, 431 (2004) 338-342.
- [63] C.J. Lilley, M. Bakhetia, W.L. Charlton, P.E. Urwin, Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes, *Mol Plant Pathol*, 8 (2007) 701-711.
- [64] M.N. Rosso, J.T. Jones, P. Abad, RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes, *Annu Rev Phytopathol*, 47 (2009) 207-232.
- [65] P.K. Kandoth, S. Ranf, S.S. Pancholi, S. Jayanty, M.D. Walla, W. Miller, G.A. Howe, D.E. Lincoln, J.W. Stratmann, Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007) 12205-12210.
- [66] S.H. An, H.W. Choi, I.S. Hwang, J.K. Hong, B.K. Hwang, A novel pepper membrane-located receptor-like protein gene *CaMRP1* is required for disease susceptibility, methyl jasmonate insensitivity and salt tolerance, *Plant Mol Biol*, 67 (2008) 519-533.
- [67] G. Dubreuil, M. Magliano, M.P. Dubrana, J. Lozano, P. Lecomte, B. Favery, P. Abad, M.N. Rosso, Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode, *J Exp Bot*, 60 (2009) 4041-4050.

- [68] G. Huang, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 14302-14306.
- [69] J. Li, T.C. Todd, H.N. Trick, Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants, *Plant Cell Rep*, 29 (2010) 113-123.
- [70] J.D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, S. Brunak, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J Mol Biol*, 340 (2004) 783-795.
- [71] J. Li, T.C. Todd, J. Lee, H.N. Trick, Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control, *Plant Biotechnol J*, (2011).
- [72] M. Bakhtia, W. Charlton, H.J. Atkinson, M.J. McPherson, RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol Plant Microbe Interact*, 18 (2005) 1099-1106.
- [73] Q. Chen, S. Rehman, G. Smant, J.T. Jones, Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi, *Mol Plant Microbe Interact*, 18 (2005) 621-625.
- [74] E. Fanelli, M. Di Vito, J.T. Jones, C. De Giorgi, Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi, *Gene*, 349 (2005) 87-95.
- [75] C.J. Lilley, S.A. Goodchild, H.J. Atkinson, P.E. Urwin, Cloning and characterisation of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA, *Int J Parasitol*, 35 (2005) 1577-1585.
- [76] N.W. Alkharouf, V.P. Klink, B.F. Matthews, Identification of *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode [SCN]) cDNA sequences with high identity to those of *Caenorhabditis elegans* having lethal mutant or RNAi phenotypes, *Exp Parasitol*, 115 (2007) 247-258.
- [77] M. Bakhtia, P.E. Urwin, H.J. Atkinson, QPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host, *Mol Plant Microbe Interact*, 20 (2007) 306-312.
- [78] G. Dubreuil, M. Magliano, E. Deleury, P. Abad, M.N. Rosso, Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism, *New Phytol*, 176 (2007) 426-436.
- [79] M.J. Kimber, S. McKinney, S. McMaster, T.A. Day, C.C. Fleming, A.G. Maule, flp gene disruption in a parasitic nematode reveals motor dysfunction and unusual neuronal sensitivity to RNA interference, *FASEB J*, 21 (2007) 1233-1243.
- [80] J.E. Park, K.Y. Lee, S.J. Lee, W.S. Oh, P.Y. Jeong, T. Woo, C.B. Kim, Y.K. Paik, H.S. Koo, The efficiency of RNA interference in *Bursaphelenchus xylophilus*, *Mol Cells*, 26 (2008) 81-86.

- [81] V.P. Klink, K.H. Kim, V. Martins, M.H. Macdonald, H.S. Beard, N.W. Alkharouf, S.K. Lee, S.C. Park, B.F. Matthews, A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*, *Planta*, 230 (2009) 53-71.
- [82] A.S. Sindhu, T.R. Maier, M.G. Mitchum, R.S. Hussey, E.L. Davis, T.J. Baum, Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success, *J Exp Bot*, 60 (2009) 315-324.
- [83] J. Li, T.C. Todd, T.R. Oakley, J. Lee, H.N. Trick, Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe, *Planta*, 232 (2010) 775-785.
- [84] T.J. Baum, R.S. Hussey, E.L. Davis, Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism, *Genet Eng (N Y)*, 28 (2007) 17-43.

**Tabela I.i.** Sumário das principais características das prováveis proteases anotadas a partir do genoma de *M. incognita*. (Adaptado de [43]).

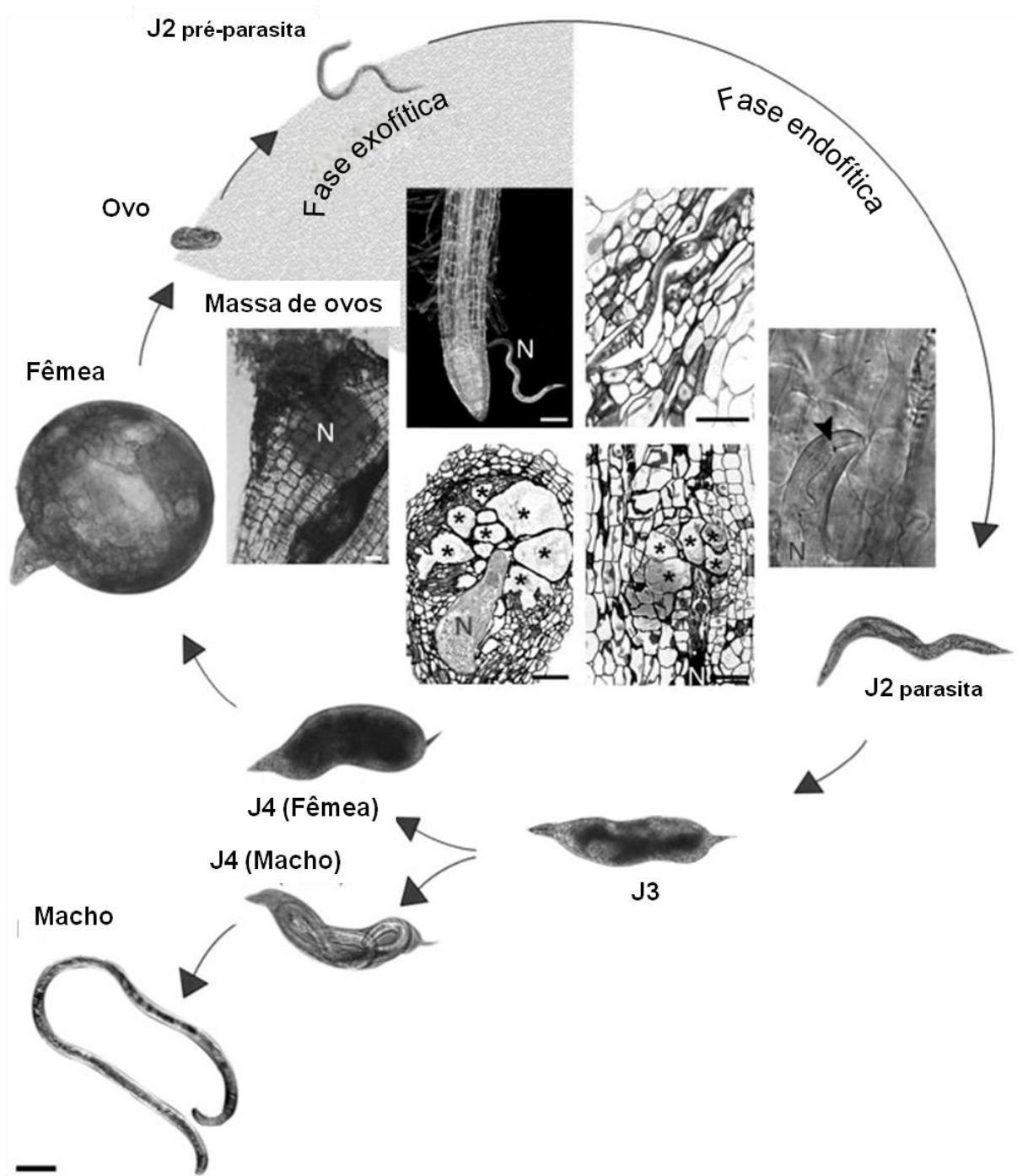
	Classe Catalítica					Total
	Aspártica	Cisteínica	Metalo	Serínica	Treonínica	
<b>Nº de modelos gênicos</b>	26	106	136	52	14	334
<b>Nº de famílias de proteases</b>	3	11	16	10	3	43
<b>Proteases secretadas<sup>a</sup></b>	12	23	15	14	0	64
<b>Proteases que possuem ESTs</b>	11	53	70	21	10	165
<b>Nº de proteases com maior similaridade com proteases de nematoides<sup>b</sup></b>	16	66	124	41	12	259

<sup>a</sup>Baseado na análise do programa SignalP [70]

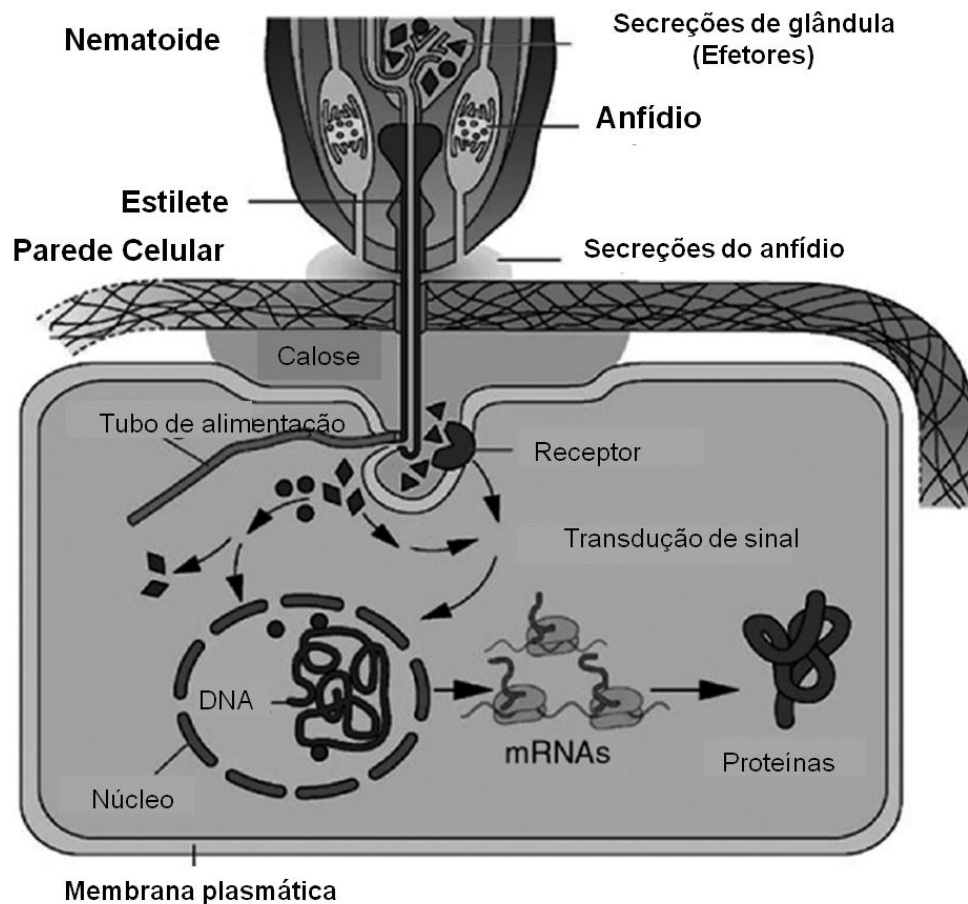
<sup>b</sup>De acordo com busca por BlastX com o banco não redundante (nr)

**Tabela I.ii.** Genes-alvo de fitonematoides controlados efetivamente por RNAi. (Adaptado de [71]).

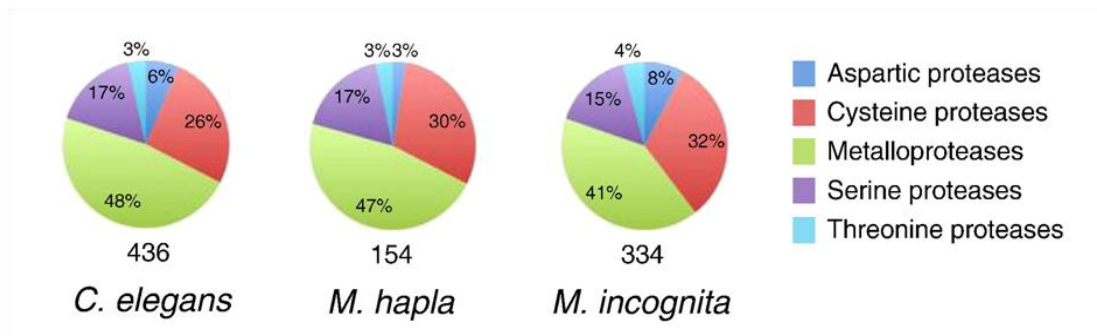
Nome do gene/ n. de acesso (Gene Bank)	Provável função do gene-alvo	Espécie de nematoide	Método de ingestão	Fenótipo e percentagem de redução	Referências
hgctl, AF498244	C-type lectin	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ 41% no n. de nematoides estabelecidos	[47]
hgcp-l	Cysteine proteinase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ 40% no n. de nematoides estabelecidos	[47]
pMiDuoX1, DQ082753	Dual oxidase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓ de até 70% no n. de nematoides estabelecidos e diminuição da fecundidade	[72]
Gr-eng-1, AF004523	β-1,4-endoglucanase pharyngeal	<i>G. rostochiensis</i>	Soaking	↓ ~ 50% no n. de nematoides estabelecidos	[73]
Gr-ams-1, AJ270995	Secreted amphid protein	<i>G. rostochiensis</i>	Soaking	Habilidade de localizar e penetrar raízes reduzida	[73]
AY013285	Chitin synthase	<i>M. artiellia</i>	Soaking	Atraso na eclosão dos ovos	[74]
Hg-amp-1, AY883023	Amino peptidase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ 61% do n. de fêmeas reprodutivas	[75]
16D10, DQ841121–DQ841123	Secreted peptide	<i>M. incognita</i>	Soaking	74%–81% de diminuição no n. de nematoides estabelecidos	[68]
Hg-rps-23, BF014259	Ribosomal protein	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ da viabilidade de J2	[76]
hg-eng-1, AF006052	β-1,4-endoglucanase	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ do n. de nematoides estabelecidos	[77]
hg-syv46, AF273728	Secreted peptide SYV46	<i>H. glycines</i>	Soaking	↓ do n. de nematoides estabelecidos	[77]
Mi-gsts-1, EL784458	Glutathione-S transferase	<i>M. incognita</i>	Soaking	52%–71% ↓ fecundidade	[78]
Flp	FMRFamide-like peptides	<i>G. pallida</i>	Soaking	Inibição da mobilidade	[79]
Mi-cpl-1	Cysteine proteinase	<i>M. incognita</i>	Soaking	↓ 60% no n. de nematoides estabelecidos	[42]
Bx-hsp-1, DQ785812	Heat shock protein 70, cytochrome C	<i>B. xylophilus</i>	Soaking	↓ da viabilidade de J2-J3 em altas temperaturas	[80]
Bx-myo-3	Myosin heavy chain, tropomyosin	<i>B. xylophilus</i>	Soaking	↓ da viabilidade de J2-J3 em altas temperaturas e locomoção anormal	[80]
AW871671	Integrase	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓ >90% de nematoides estabelecidos	[59]
AW828516	Splicing factor	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	↓ >90% de nematoides estabelecidos	[59]
16D10, DQ841121–DQ841123	Secreted peptide	<i>M. arenaria</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. hapla</i>	<i>In planta</i>	↓ de 63%–90% no n. e tamanho de galhas	[68]
MSP	Major sperm protein	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ de até 68% no n. de ovos	[60]
Hg-rps-3a, CB379877	Ribosomal protein 3a	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 87% de cistos (fêmeas)	[81]
Hg-rps-4, CB278739	Ribosomal protein 4	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 81% de cistos (fêmeas)	[81]
Hg-spk-1, BI451523.1	Spliceosomal SR protein	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 88% de cistos (fêmeas)	[81]
Hg-snb-1, BF014436	Synaptobrevin	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 93% de cistos (fêmeas)	[81]
4G06, AF469060	Ubiquitin-like	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓ de 23%–64% de fêmeas em desenvolvimento	[82]
3B05, AF469058	Cellulose binding protein	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓ de 12%–47% de fêmeas em desenvolvimento	[82]
8H07, AF500024	SKP1-like	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓ >50% de fêmeas em desenvolvimento	[82]
10A06, AF502391	Zinc finger protein	<i>H. schachtii</i>	<i>In planta</i>	↓ 42% de fêmeas em desenvolvimento	[82]
Y25, CB824330	Beta subunit of the COPI complex	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 81% de ovos	[69, 83]
Prp-17, AF113915	Pre-mRNA splicing factor	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 79% de ovos	[83]
Cpn-1, GU074018	Unknown protein	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	↓ 95% de ovos	[83]



**Figura I.i.** O ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* (Adaptado de Abad e colaboradores (2008) [13]). Juvenis de segundo estágio (J2) penetram a raiz e migram entre as células para chegar ao cilindro vascular da planta. O estilete (ponta da seta na eletromicrografia de J2) conectado ao êsotago é usado para perfurar a parede celular, liberar as secreções esofágicas e ingerir nutrientes. Cada J2 induz a diferenciação de cinco a sete células em células de alimentação multinucleadas e hipertrofiadas (\*). Estas células gigantes suprem os nematoides com nutrientes (N). O nematoide se torna sedentário e passa por três mudas (J3, J4, adulto). Ocasionalmente, machos se desenvolvem e migram para fora da raiz. Entretanto, acredita-se que eles não têm função na reprodução. A fêmea em forma de pera produz os ovos que são liberados na superfície da raiz. A embriogênese dentro do ovo é seguida pela primeira muda, gerando os juvenis de segundo estágio (J2). Barra = 50 mm.

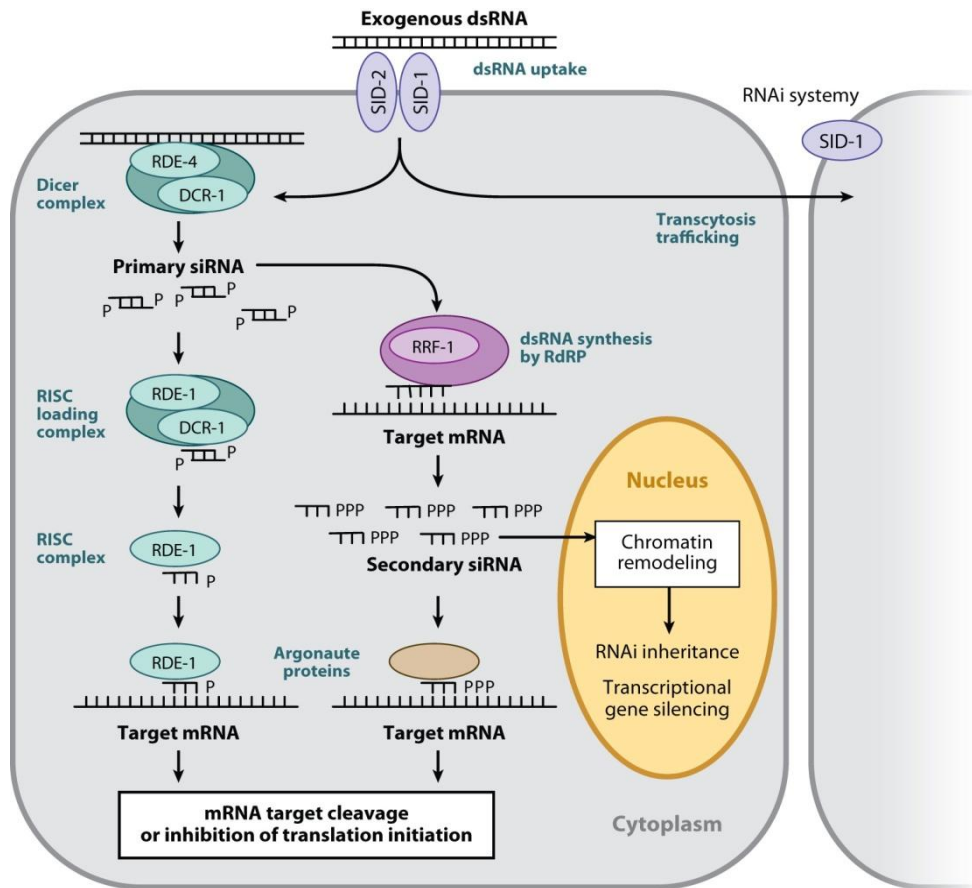



**Figura I.ii.** Genes de parasitismo (efetores) de fitonematoides (modificado de [84]). Esquema para exemplificar as proteínas efetoras de parasitismo que estão diretamente envolvidas com a interação planta-nematoide. Esses efetores são secretados através do estilete na planta parasitada onde desempenham importantes funções durante a indução das células de alimentação. Estas proteínas podem agir como ligantes extra ou intracelular, componentes de transdução de sinal, serem importadas para o núcleo, ou agir nos componentes citoplasmáticos, tudo que pode modificar o conteúdo da célula da planta. Além disso, os efetores tem função durante a nutrição como a formação dos tubos de alimentação.



**Figura I.iii.** Distribuição relativa das cinco classes catalíticas das proteases presentes nos genomas dos nematoides *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla* e *Caenorhabditis elegans*. Para cada nematoide o número total de proteases é indicado. Figura adaptada de [43].





 Rosso MN, et al. 2009.  
 Annu. Rev. Phytopathol. 47:207–32

**Figura I.iv.** Representação esquemática da rota de exo-RNAi em *Caenorhabditis elegans*.  
 Adaptado de [64].

## II – HIPÓTESES

- As proteases de *M. incognita* estão envolvidas no processo parasítico do nematoide desempenhando funções variadas durante o parasitismo e são alvos interessantes para o controle deste fitonematoide;
- As moléculas que são produzidas e armazenadas nas glândulas esofágicas de *M. incognita* e são secretadas pelo nematoide durante a infecção das raízes do hospedeiro desempenham papel relevante no estabelecimento e manutenção do parasitismo;

## III – JUSTIFICATIVA

A inadequação dos métodos de controle usados atualmente aumenta as evidências de que o uso de novas tecnologias como parte de uma estratégia de manejo integrado de nematoides, fornecerá uma solução com benefícios para o produtor, o consumidor e o ambiente. Compreender melhor as interações entre a planta e o fitonematoide é um passo essencial para se desenvolver estratégias de controle mais eficientes. As proteínas efetoras de parasitismo são moléculas-chave no sucesso parasítico de *Meloidogyne incognita*, e, portanto podem ser alvos de estudos de validação funcional para desvendar os papéis específicos destas moléculas na interação planta-nematoide.

A compreensão do modo de ação do nematoide ao parasitar a planta pode fornecer informações essenciais para o desenvolvimento de uma estratégia de controle baseada na intervenção das moléculas efetoras responsáveis pelo parasitismo. Este conhecimento aliado aos avanços recentes na biotecnologia e

engenharia genética pode resultar na geração de variedades resistentes a nematoides.

O desenvolvimento de variedades comerciais resistentes a nematoides poderia aumentar a produtividade de importantes culturas do país, além de reduzir consideravelmente o emprego de nematicidas, diminuindo satisfatoriamente o impacto ambiental, tornando o agronegócio nacional mais lucrativo e principalmente, sustentável.

#### **IV – OBJETIVO GERAL**

Analisar funcionalmente o papel de moléculas candidatas a efetoras de parasitismo de *M. incognita*, para o melhor entendimento da interação planta-nematoide.

## V-CAPÍTULOS

### **CAPÍTULO 1: Avaliação funcional de genes de *Meloidogyne incognita*: interferência na expressão de três proteases por intermédio de RNAi *in planta* reduz a taxa de parasitismo**

#### **RESUMO**

Para entender melhor a função das proteases digestivas de *M. incognita* no processo de parasitismo, três genes que codificam as proteases Mi-Asp-1, Mi-Ser-1 e Mi-Cpl-1 foram estudados utilizando a estratégia de silenciamento gênico por intermédio de RNA interferente (RNAi). Fragmentos dos genes foram clonados isoladamente no vetor binário para expressão de dsRNA (pK7GWIWG2(I)) em tabaco, e as plantas foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*. Também foi feita uma construção onde os fragmentos das três proteases foram fusionados para testar o silenciamento de vários genes simultaneamente. Para avaliar o efeito da expressão de dsRNA complementar aos RNAs das proteases no ciclo de vida do nematoide, bioensaios foram realizados com a inoculação de 2000 J2 pré-parasíticos por planta, e a avaliação foi efetuada 45 dias após a inoculação (DAI). O número de ovos e de J2 eclodidos, e a taxa de eclosão dos ovos foram aferidos. A quantidade relativa dos transcritos dos genes das proteases em J2 eclodidos foi aferida por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR). Após 45 dias da coleta dos ovos verificou-se que nos eventos transgênicos o número de ovos, de J2 eclodidos, e taxa de eclosão foram menores em relação ao controle. Ao se avaliar a expressão do transcrito dos genes *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* nos ovos oriundos dos eventos transgênicos por qRT-PCR foi observada uma redução mais significativa no gene *Mi-cpl-1*. Os dados de qRT-PCR confirmam o silenciamento parcial do gene *Mi-cpl-1*, o

que provavelmente está correlacionado com a menor fecundidade das fêmeas e do número de J2 eclodidos de *M. incognita* nos eventos transgênicos. Apesar de não ter sido detectado redução na quantidade de transcritos nos genes *Mi-asp-1* e *Miser-1* na progênie, é possível que esses genes tenham sido silenciados nos estágios anteriores, que indicaria a atuação dos mesmos em processos como, infecção, estabelecimento do sítio de alimentação, embriogênese e muda. O entendimento das funções das proteases no parasitismo de *M. incognita* é essencial para conhecer melhor a relação planta-nematoide, e conseqüentemente permitir o desenvolvimento de estratégias de controle desse organismo de forma eficiente e sustentável.

**Palavras-chave:** Proteases; RNA interferente; validação funcional de genes; interação planta-nematoide.

## 1.1. INTRODUÇÃO

Os nematoides endoparasitas sedentários do gênero *Heterodera*, *Globodera* (conhecidos como nematoides formadores de cistos, NFC) e *Meloidogyne* (nematoides formadores de galhas, NFG) são os principais nematoides fitopatogênicos causando prejuízos de cerca de 125 bilhões de dólares (US\$) anualmente em todo o mundo [1]. O nematoide formador de galhas *Meloidogyne incognita*, é, provavelmente, a espécie de fitonematoide mais prejudicial à agricultura mundial [2], principalmente devido ao seu hábito polífago, ampla distribuição em todo o mundo, reprodução por partenogênese mitótica e alta taxa de reprodução.

Nematoides parasitas obrigatórios são altamente especializados e desenvolveram maneiras particulares de infectar seus hospedeiros. Para auxiliar seu ciclo de vida sedentário, estes nematoides injetam proteínas efetoras de parasitismo dentro de células do hospedeiro, onde serão formados os sítios de alimentação.

Essas proteínas efetoras alteram a taxa normal de divisão da célula da raiz, resultando na rediferenciação celular que culmina na formação dos sítios de alimentação multinucleados e metabolicamente ativos, conhecidos como células gigantes (NFG) e sincícios (NFC) [3].

Proteases são enzimas proteolíticas ubíquas que clivam ligações peptídicas internas em proteínas e peptídeos. Elas têm sido caracterizadas em uma diversa gama de organismos incluindo bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados. No caso de parasitas helmínticos, as funções das proteases nas interações parasita-hospedeiro incluem desde a invasão de tecidos do hospedeiro, passando pela nutrição do parasita, até a evasão das respostas de defesa do hospedeiro [4]. Proteases das cinco maiores classes estão presentes nos fitonematoides *M. incognita* e *Meloidogyne hapla* [5]. Em *M. incognita* as metaloproteases foram preditas a partir do genoma [6] como as mais abundantes, seguida pelas proteases cisteínicas, serínicas, aspárticas e por fim, menos abundantes, as proteases treonínicas.

Algumas proteases já haviam sido descritas anteriormente em *M. incognita*, como duas proteases muito semelhantes do tipo catepsina L (cisteínica) [7, 8], uma protease serínica do tipo quimo tripsina [9], e uma aspártica do tipo catepsina D [10]. Além disso, outra protease aspártica foi descrita tendo função importante no processo de parasitismo de *M. incognita*, sendo secretada no apoplasto da planta [11]. Devido a estas funções metabólicas fundamentais nas interações parasita-hospedeiro, as proteases são alvos importantes de intervenção como forma de estudo do parasitismo e de controle [12].

Com a recente descoberta da via de controle da expressão gênica por intermédio das moléculas de pequenos RNAs interferentes (siRNA) e dos microRNAs (miRNA), muitos estudos tem sido desenvolvidos para explorar genes e

o desenvolvimento a partir de uma nova perspectiva [13]. O entendimento deste fenômeno ubíquo tem revelado o RNA interferente (RNAi) como uma poderosa ferramenta para manipular a expressão gênica e realizar análises de suas funções [14]. Apesar da indução do RNAi através da ingestão de RNA dupla fita (dsRNA), em experimentos *in vitro*, ser bastante eficiente no nematoide modelo *Caenorhabditis elegans*, a ingestão de dsRNA por fitonematoides é mais difícil. Isto devido a esses organismos serem parasitas obrigatórios e necessitarem do hospedeiro vivo para se alimentarem e desenvolverem, e nos estágios do nematoide onde ficam fora do hospedeiro, estes não se alimentam [15].

Os primeiros experimentos que foram realizados com RNAi *in vitro* em fitonematoides, foi utilizando o neurotransmissor octopamina para estimular a ingestão de dsRNA por estádios pré-parasitas de *Heterodera glycines* e *Globodera pallida* [16]. Outros estudos em *M. incognita* também mostraram supressão dos genes utilizando a mesma técnica *in vitro* [8, 17-20]. Esses resultados levaram a testar o dsRNA liberado *in planta* por Huang e colaboradores [18], no qual o gene alvo foi o da proteína 16D10 que é expressa nas glândulas esofágicas, e por Yadav e colaboradores [21] que silenciaram um fator de processamento de RNA e uma integrase. Em ambos os casos, o sucesso de parasitismo dos nematoides foi reduzido. Atualmente, vários trabalhos têm sido realizados expressando dsRNA *in planta*, tanto para análise de funções de genes [22, 23], como para estudo de genes essenciais que possam ser utilizados para controle de nematoides [24-28].

Baseado nesses argumentos, estudou-se a função de três proteases no parasitismo de *M. incognita* utilizando a técnica de RNAi expressando dsRNA para os genes alvo em plantas de *Nicotiana tabacum*. Também foi testado um novo método de silenciamento gênico simultâneo numa mesma construção para avaliar

vários genes ao mesmo tempo, como também testar se há efeito aditivo na obstrução do parasitismo quando se faz silenciamento concomitante de genes

.



## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é, portanto, avaliar a importância de três proteases para o desenvolvimento e/ou parasitismo de *Meloidogyne incognita*, através da técnica de silenciamento gênico induzido por RNA interferente em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), testando comparativamente a eficiência do silenciamento simultâneo como de genes individuais.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Selecionar, a partir de uma biblioteca de ESTs de J2 de *M. incognita* produzida em nosso laboratório e dos bancos de dados público, genes que codificam para proteases potencialmente relacionadas com o processo de parasitismo do fitonematoide *M. incognita*;
- Verificar por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) o acúmulo de transcritos de cada gene estudado nos diferentes estágios de vida de *M. incognita*;
- Clonar os fragmentos dos genes estudados e transformar *N. tabacum* para expressão de RNA dupla fita (dsRNA);
- Realizar teste de susceptibilidade das plantas transgênicas expressando dsRNA para as proteases infectadas por *M. incognita*;
- Avaliar o silenciamento dos genes das proteases selecionados em *M. incognita* por qRT-PCR;
- Avaliar a capacidade parasítica dos J2 oriundos das plantas expressando dsRNA em ensaios de reinfecção em plantas não transformadas.

### 1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1.3.1. Cultura e coleta de *Meloidogyne incognita*

A cultura de *M. incognita*, raça 3, foi mantida em pantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, L.), cv. Santa Cruz e cultivar Kada Gigante. A coleta de nematoides em seus diferentes estágios de desenvolvimento foi realizada a partir de 28 dias após a inoculação (DAI), tendo se estendido até 90 DAI.

Os ovos foram extraídos de acordo com Hussey e Barker [29] com pequenas modificações. Raízes de tomateiro foram trituradas em liquidificador por dois minutos, em hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5%. A contagem dos ovos foi feita em lâmina de Peters, utilizando microscópio óptico de luz [30].

Para a coleta de juvenis de segundo estágio, J2 pré-parasíticos, a suspensão de ovos foi submetida à técnica de funil de Baermann modificada, mantidas a temperatura ambiente, em um recipiente contendo água destilada para permitir a eclosão dos ovos e subsequente coleta dos nematoides. A coleta de J2 eclodidos foi realizada a cada dois dias durante uma semana.

Para a coleta de fêmeas, as raízes infectadas foram incubadas em solução de 25% (v/v) pectinase por 16 horas. Em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente em peneira de 100 mesh, e foram sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 10 minutos em suspensão de caulim (substrato inerte). As fêmeas foram ressuspendidas em 40% (m/v) de sacarose e precipitadas novamente por centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. Após este processo, as fêmeas foram novamente depositadas em peneira de 100 mesh, lavadas em água destilada e transferidas para um recipiente, onde foi realizada a coleta manual.

### **1.3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA de diferentes estágios de vida de *M. incognita***

O RNA total de ovos, J2 pré-parasíticos e fêmeas maduras de *M. incognita* foi extraído utilizando o RNeasy Mini kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Os RNAs extraídos foram eluídos em água e armazenados a - 80 °C até o uso. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa SuperScript™ II (Invitrogen, EUA) a partir de RNA total de ovo, J2 ou fêmea de *M. incognita*. Para a síntese, foi utilizado 2 µg de RNA total, primer Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (2,5 ng/µL), mistura de dNTP (0,5 mM cada), e água bi-destilada até 12 µL. Em seguida, a mistura foi aquecida a 65 °C por 5 min e imediatamente resfriada no gelo. Posteriormente, foi adicionada a reação 4 µL do Tampão “5X First-Strand”, 2 µL de DTT 0,1M, e 200 U da enzima SuperScript™ Transcriptase Reversa. A reação foi incubada a 42 °C por 50 min., e a enzima foi inativada aquecendo a reação a 70 °C por 15 min. Por fim, foi adicionado 2U de RNase H e a reação foi incubada a 37 °C durante 20 min., sendo que ao final da síntese os cDNAs foram armazenados a - 20 °C.3.4.

### **1.3.3. Quantificação da expressão dos transcritos dos genes *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* em diferentes estágios (ovo, J2 e J4/fêmea) de vida de *M. incognita* por qRT-PCR**

Os oligonucleotídeos iniciadores para cada gene foram desenhados a partir das sequências de nucleotídeos de cada gene disponíveis em banco de dados (GenBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Para realização da qRT-PCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela

1.1). O gene utilizado para normalização foi o da subunidade ribossômica 18S (mi18S) de acordo com Dubreuil e colaboradores [31] utilizando os oligonucleotídeos 18S-F-852 (5'-ACCGTGGCCAGACAAACTAC-3') e 18S-R-966 (5'-GATCGCTAGTTGGCATCGTT-3'). Cada reação foi feita num volume final de 10 µL, sendo 5 µL de SYBR Green PCR Mix (LGC), 2 µL de cDNA, 2,6 µL de H<sub>2</sub>O bi-distilada e cada oligonucleotídeo a 0,2 µM (direto e reverso). Os ciclos 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 oligonucleotídeo (60-94 °C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de oligonucleotídeos ou contaminação da amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em duplicata e controles negativos, contendo água ao invés de cDNA, foram incluídos para verificar contaminações nas amostras.

A eficiência de cada oligonucleotídeo para cada reação e os ciclos limiares (do inglês cycle threshold - CTs) foi calculada individualmente a partir do software qPCR miner, <http://www.miner.ewindup.info> [32]. A expressão relativa de cada gene foi calculada de acordo com o método de Pfaffl [33] utilizando o programa qBase plus (Biogazelle, Ghent, Bélgica).

#### **1.3.4. Seleção dos fragmentos dos genes das proteases de *M. incognita* para silenciamento gênico**

Utilizando um banco de ESTs de J2 de *M. incognita*, produzida previamente, bem como sequências disponíveis no banco de dados (GenBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), foram selecionadas três proteases de *M. incognita* para serem alvos de silenciamento pela técnica de RNA interferente (RNAi). Os genes utilizados nesse estudo foram uma protease aspártica – *Mi-asp1*

(DQ3608270) [10], uma protease serínica – *Mi-ser1* (AY714229) [9], e uma protease cisteínica – *Mi-cpl-1* (AJ557572) [7].

Para assegurar que as regiões escolhidas para RNAi não provoquem um efeito “off-target”, ou seja, o silenciamento de genes não alvo, as sequencias nucleotídicas das proteases foram comparadas com as sequencias disponíveis no GeneBank, utilizando a ferramenta BLASTn (versão 2.2.22) [34].

### **1.3.5. Construção dos vetores para silenciamento gênico *in planta* das proteases de *M. incognita*.**

Inicialmente, os fragmentos (regiões selecionadas) dos genes das três proteases foram fusionados para serem subclonados juntos numa mesma construção, para expressar um dsRNA específico para as três proteases em uma mesma planta e, em seguida subclonados separadamente em construções distintas. A construção contendo os fragmentos das três proteases fusionadas foi sintetizada e subclonada no vetor pBlueScript II pela empresa Epoch Biolabs (Sugar Land, TX, EUA).

Para se obter as construções para a expressão de dsRNA contra as sequencias referidas no item anterior, foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 1.1) contendo os sítios attB1 e attB2, necessários para clonagem em vetores que utilizam o método de Gateway<sup>®</sup> (Invitrogen, EUA). Utilizando os oligonucleotídeos MiASP1\_GTWY F e R, MiSER\_GTWY F e R, e MiCIS\_GTWY F e R, os fragmentos foram clonados separadamente a partir de cDNA de J2 pré-parasítico no vetor pGEM T-easy (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, todos os fragmentos e a fusão foram subclonados no vetor de origem pDONR<sup>™</sup> 221 (Figura 1.1 A), utilizando-se um sistema de recombinação da BP

clonase, do kit “PCR Cloning System with Gateway® Technology” (Invitrogen, EUA), sendo então, transferidos novamente por recombinação (utilizando LR clonase) para o vetor binário pK7GWIWG2(I) [35] (Figura 1.1B) utilizado para expressar dsRNA em plantas.

### **1.3.6. Transformação de *Nicotiana tabacum* com as construções que expressam dsRNA via *Agrobacterium tumefaciens***

As construções foram inseridas em *A. tumefaciens*, linhagem GV3101, por transformação via eletroporação e selecionadas em meio de crescimento bacteriano LB sólido contendo 100 µg/mL de rifampicina e 300 µg/mL de estreptomicina durante 48 horas a 28 °C. Uma colônia isolada foi escolhida e inoculada em meio LB contendo os antibióticos descritos anteriormente, a 28 °C, 150 rpm, durante 16 horas, até atingir a fase exponencial de crescimento ( $DO_{600}$  de 0,6 a 1,0). Em seguida, as células foram precipitadas por centrifugação a 5000 g por 5 min., o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em NaCl 0,85%.

De acordo com o protocolo descrito por Gallois e Marinho [36] as folhas de tabaco (*N. tabacum*) variedade SR1 foram micropropagadas *in vitro*, cortadas em pedaços de aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup> e transferidas imediatamente para o meio MS [37] líquido e em seguida foi adicionado 200 µL da suspensão bacteriana descrita acima. Os explantes foliares foram incubados nesse meio por aproximadamente 20 minutos sob leve agitação. Posteriormente os explantes foram transferidos para placas com meio MS sólido contendo 1 mg/L do hormônio 6-benzilaminopurina (BAP), para indução de brotamento. Após 48 horas, os explantes foram transferidos para um novo meio MS sólido contendo 1mg/L de BAP, 500 mg/L de cefotaxima (inibidor de crescimento bacteriano) e 100 mg/L de canamicina, antibiótico de

seleção dos explantes transformados. Estes explantes foram colocados em sala de fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C.

Após aproximadamente quatro semanas de incubação, os fragmentos foliares foram cortados em quatro pedaços e foram transferidos para um novo meio. Depois de mais quatro semanas de incubação nas condições citadas, os brotos maiores que 0,8 cm foram transferidos individualmente para recipientes do tipo “magenta” contendo meio MS sólido com 250 mg/L de cefotaxima e 100 mg/L de canamicina, para permitir o enraizamento. Quando as plantas desenvolveram raízes, 2-3 semanas após a transferência para o recipiente tipo “magenta”, as mesmas foram transferidas para copos plásticos de 300 mL contendo uma mistura de areia e solo, e aclimatadas em casa de vegetação. Duas semanas após a transferência para os copos, as plantas (geração T0) foram transferidas para sacos de 5 L para permitir o desenvolvimento e a produção de sementes, que durou aproximadamente 2 meses.

#### **1.3.7. Seleção das plantas transformadas com as construções para silenciamento gênico das proteases de *M. incognita***

As sementes geradas na geração T0 foram coletadas após o período de maturação e armazenadas até o uso. Para seleção das plantas transformadas, as sementes tiveram suas superfícies desinfetadas por incubação em álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio 1% por 2 h, e 4 lavagens com água estéril. Em seguida, foram posicionadas em placas com meio MS sólido contendo 100 mg/L de canamicina.

As sementes que germinaram e enraizaram foram inicialmente genotipadas em “pool” de cinco plântulas utilizando o Extract-N-Amp Plant PCR kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), para detectar a presença do fragmento transgênico

correspondente no genoma de cada evento gerado no sentido senso e anti-senso com oligonucleotídeos que se anelam tanto no fragmento gênico como no intron do vetor (Tabela 1.1). Em seguida, foi extraído o RNA total de um “pool” de cinco plântulas inteiras, dez dias após a germinação, para cada evento de transformação utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Este RNA foi utilizado para analisar a expressão transgênica da estrutura de grampo do dsRNA formada pelo íntron separador (vetor pK7GWIWG2(I)) de cada construção, por meio da metodologia adaptada de Patel e colaboradores [23]. Esta análise foi feita via RT-PCR utilizando o kit para síntese da primeira fita de cDNA e a transcriptase reversa SuperScript™ II (Invitrogen, EUA), como descrito no item 3.2, utilizando 1 µg de RNA total. O oligonucleotídeo iniciador específico para o íntron do vetor pK7GWIWG2(I), pK7-Intron-RT-R (Tabela 3.1), foi utilizado para sintetizar a primeira fita de cDNA para cada evento de transformação, e estes cDNAs foram utilizados como molde para a amplificação de um fragmento de 150 pb utilizando os oligonucleotídeos pK7-Intron-F e pK7-Intron-R (Tabela 3.1).

Após a confirmação da presença do transgene por PCR e do fragmento do íntron do vetor por RT-PCR, o restante das plântulas foram transferidas para copos plásticos de 300 mL para aclimação em casa de vegetação. Depois da aclimação as plantas foram genotipadas novamente, individualmente, por PCR utilizando o Extract-N-Amp Plant PCR kit. As plantas genotipadas como positivas foram utilizadas em bioensaios de infecção por *M. incognita*.



### **1.3.8. Bioensaios de infecção de *M. incognita* em eventos de *N. tabacum* expressando dsRNA e reinfecção em plantas não transformadas**

Após 15 dias de aclimação, oito a dez plantas de cada evento de transformação foram utilizadas em cada repetição biológica para os bioensaios de inoculação de J2 pré-parasíticos de *M. incognita*. Aproximadamente 2000 J2 foram inoculados por planta e o bioensaio foi mantido em casa de vegetação. Seis semanas após a inoculação as raízes de cada planta foram processadas para a extração de ovos de acordo com Hussey e Barker [29]. Foram avaliados neste bioensaio o número de ovos por grama de raiz, o número de J2 eclodidos por grama de raiz e a relação entre o número de J2 eclodidos e o número de ovos inicial.

Para o experimento de reinfecção de J2 pré-parasíticos oriundos dos eventos transgênicos em plantas não transformadas de acordo com Dubreuil e colaboradores [31], foram inoculados aproximadamente 800 J2 por planta. De cinco a seis plantas foram utilizadas em cada tratamento. Este experimento conteve duas repetições biológicas e foram avaliados o número de galhas e o número de massas de ovos.

Para a avaliação estatística de todos os dados foi utilizada a análise de modelos lineares generalizados (MLG), e após a definição do melhor modelo de ajuste para cada grupo de dados (por exemplo: número de ovos, número de J2 eclodidos, etc.) foi realizada uma análise de variância dos desvios (ANODEV) (Pacote “car”, programa R). Nos casos em que a ANODEV foi significativa, os tratamentos foram submetidos à análise de contrastes (Pacote “contrast”, programa R) para determinar se existem diferenças significativas entre os tratamentos [38].

### **1.3.9. RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes das proteases em *M. incognita* que infectaram eventos de *N. tabacum* expressando dsRNA.**

Plantas de tabaco que expressaram o dsRNA de cada evento foram transplantadas do meio MS para o solo em copos plásticos de 300 mL, e aclimatadas em casa de vegetação. Foram utilizadas de 5 a 7 plantas para cada evento e aproximadamente 2000 J2 pré-parasíticos foram inoculados por planta. Seis semanas após a inoculação as raízes foram processadas e os ovos extraídos de acordo com Hussey e Barker [29].

Para cada evento os ovos e os J2 de *M. incognita* foram macerados e triturados em “pool” com nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo, e o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Mini kit (Qiagen, EUA). O RNA foi tratado com DNase I Turbo (Ambion, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o “SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, EUA) utilizando 500 ng de RNA total.

Para realização e análise de qRT-PCR foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 1.3.3.

## 1.4. RESULTADOS

### 1.4.1. Seleção dos genes de proteases e quantificação do acúmulo dos transcritos destes genes em diferentes estágios de vida de *M. incognita*

Para entender melhor a função das proteases digestivas no processo de fitoparasitismo de *M. incognita* foram selecionados três genes, cada um de uma classe diferente de proteases: uma protease aspártica do tipo catepsina D, *Mi-asp-1* (DQ360827), uma protease serínica do tipo quimotripsina, *Mi-ser-1* (AY714229), e uma protease cisteínica do tipo catepsina L, *Mi-cpl-1* (AJ557572). As proteases aspártica e serínica foram previamente isoladas, por RT-PCR, 5' e 3' RACE, a partir de uma biblioteca de cDNA de *M. incognita* em nosso laboratório [9, 10]. Já a protease cisteínica foi isolada a partir de cDNA de J2 de acordo com Neveu e colaboradores [7].

Para determinar em qual dos estágios de vida no qual o fitonematoide *M. incognita* acumula um maior número de transcritos das proteases estudadas, neste trabalho foi realizada a quantificação do acúmulo destes transcritos por qRT-PCR. O RNA total foi extraído dos três estágios investigados: ovo, J2 pré-parasítico e J4/Fêmea. Os RNAs totais foram utilizados para síntese de cDNA e, conseqüentemente, para o qPCR. Em todos os casos as quantidades de acúmulo de transcrito foram relativizadas com a quantidade do estágio que apresentava menor nível de acúmulo.

A quantidade detectada de transcrito do gene *Mi-asp-1* em ovo foi 2,4 vezes maior que em J4/fêmea ( $p < 0,05$ ) (Figura 1.2 A). Já em J2 pré-parasítico o acúmulo de transcritos de *Mi-asp-1* foi 5,2 vezes maior que em J4/fêmea ( $p < 0,001$ ) (Figura 1.2 A). Quando se comparou Ovo com J2 pré-parasítico, o acúmulo foi maior 2,15

vezes maior em J2 ( $p < 0,001$ ) (Figura 1.2 A). Desta forma, a ordem de acúmulo de transcrito de *Mi-asp-1* nos diferentes estágios foi: J2 pré-parasítico > Ovo > J4/Fêmea. Isto dá indícios de que esta protease aspártica estaria envolvida no processo de infecção e estabelecimento do sitio de alimentação, já que o nematoide no estágio J2 não se alimenta [39], e, portanto, esta enzima não teria função digestiva.

Quando o gene da protease serínica (*Mi-ser-1*) foi avaliado, verificou-se que o acúmulo de transcritos em Ovo foi 36,1 vezes maior do que em J2 pré-parasítico ( $p < 0,05$ ) (Figura 1.2 B). Ao avaliar-se a quantidade em J4/fêmeas, esta foi 22 vezes maior do que em J2 pré-parasítico ( $p < 0,001$ ) (Figura 1.2 B). E finalmente, ao comparar-se o acúmulo de transcrito entre ovo e J4/fêmea, ela foi 1,6 vezes maior ( $p < 0,05$ ) em ovo. A ordem de acúmulo relativo de *Mi-ser-1* foi: Ovo > J4/Fêmea > J2 pré-parasítico. Como esta enzima é mais expressa em ovo e J4/Fêmea, provavelmente ela pode estar envolvida tanto no processo de embriogênese e muda como no processo de alimentação do nematoide, funcionando como enzima digestiva.

Finalmente, ao avaliar-se o acúmulo de transcritos do gene *Mi-cpl-1*, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre ovo e J2 (Figura 1.2 C). Ao se comparar o acúmulo entre ovo e J4/fêmea, este foi 5,1 vezes maior em ovo ( $p < 0,001$ ). (Figura 1.2 C). O mesmo aconteceu quando se comparou o acúmulo em J2 pré-parasítico e J4/fêmea, com acúmulo 5,6 vezes maior em J2 ( $p < 0,05$ ). Então, a ordem relativa de acúmulo de transcritos de *Mi-cpl-1* foi: J2 pré-parasítico > Ovo > J4/Fêmea. Esta enzima por ser expressa em ovo poderia tanto função em algum processo de maturação do ovo, quanto na embriogênese e também estar envolvida no processo

de muda de J1 para J2. Além disso, como é mais expressa em J2 pré-parasítico, ela pode participar também do processo de infecção.

#### **1.4.2. Escolha de regiões de cada gene de *M. incognita* para silenciamento via RNAi.**

Para a seleção de regiões de cada gene que eram específicas para *M. incognita*, as sequências dos genes foram comparadas com o banco de dados (GenBank) utilizando a ferramenta Blast de nucleotídeos nos modos megablast, discontinuous megablast e blastn contra o banco não redundante (nr) [34]. Para verificar se haveria chance de algum efeito “off-target” para genes homólogos no genoma de *M. incognita* foi feita uma busca dentro do genoma por meio de BlastN. É importante salientar que quando este trabalho foi iniciado e os genes escolhidos, o genoma de *M. incognita* [6] ainda não tinha sido completado e nem disponibilizado. As regiões específicas foram selecionadas com um “cut-off” de 1e-05 de “E-value” tanto para buscas no GenBank contra o banco “nr”, como para as buscas dentro do genoma de *M. incognita*.

A região específica escolhida para os genes *Mi-asp-1* (199 pb), *Mi-ser-1* (210 pb) e *Mi-cpl-1* (201 pb) possuem aproximadamente 200 pb (Figura 1.3) e estas regiões não possuem qualquer similaridade com nenhuma outra sequência do banco nr nem com nenhuma sequência de outro gene homólogo do genoma de *M. incognita*. Isto evidencia a alta especificidade destas sequências para estes genes e uma chance muito pequena de ocorrer efeito “off-target”, ou seja, as possibilidades do dsRNA a ser produzido afetar a expressão de qualquer outro gene não são relevantes.

### **1.4.3. Subclonagem das regiões selecionadas dos genes das proteases em vetor binário e transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1.1, para cada fragmento selecionado, os três genes das proteases foram subclonados por recombinação no vetor pDONR 221 a partir de produto de PCR (Figura 1.4. A, C e E). Os fragmentos dos genes *Mi-asp-1* e *Mi-ser-1* foram obtidos a partir dos genes completos previamente clonados em nosso laboratório [9, 10] no vetor pGEM-T Easy. Já o fragmento do gene *Mi-cpl-1* foi obtido diretamente do cDNA total de J2 pré-parasítico de *M. incognita*.

A fusão dos três fragmentos subclonados no vetor pBluescript II foi a fonte do material a ser subclonado no vetor pDONR 221 (Figura 1.4 G e H). Todas as construções do vetor pDONR221 foram transformadas em *E. coli*, linhagem OmniMax 2T1 R, e as transformações conferidas por digestão (Figura 1.4. B, D, F e I), PCR com iniciadores específicos para cada fragmento e sequenciamento nucleotídico (dados não mostrados).

Em seguida os clones foram submetidos a uma nova recombinação para transferir os fragmentos do vetor pDONR221 para o vetor binário pK7GWIWG2(I). Todas as construções do vetor pK7GWIWG2(I) foram clonadas em *E. coli* linhagem OmniMax 2T1 R, conferidas por digestão (Figura 1.5. A, C, E e G) e PCR (dados não mostrados). Após a confirmação das clonagens no vetor binário, todas as construções foram inseridas na linhagem de *A. tumefaciens* GV3101 e as colônias conferidas por PCR (Figura 1.5. B, D, F e H).

#### **1.4.4. Seleção dos eventos transformados na geração F1 das construções pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl.**

A partir deste ponto os experimentos foram divididos em duas etapas. A primeira etapa consistiu em avaliar o silenciamento e o efeito fenotípico de eventos de transformação contendo uma única construção com os fragmentos dos genes das três proteases fusionados em “tandem” para averiguar duas questões: primeiro, (i) verificar o potencial do método de expressão de dsRNA em tandem para a validação funcional de múltiplos genes de uma só vez, a fim de estabelecer um sistema “high throughput” de validação, e (ii) avaliar possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos, quando se silencia mais de um gene com uma mesma construção, visando estratégias para controle de fitonematoides utilizando plantas geneticamente modificadas (GM).

Na segunda etapa dos experimentos foi realizada a avaliação dos eventos que continham as construções separadas, em diferentes plantas, para avaliar o efeito individual do silenciamento de cada gene. Dessa maneira, foi possível comparar os efeitos gerados pela utilização de dsRNA em “tandem” e isolados.

Após a processo de transformação via *Agrobacterium* e a cultura de tecidos para a obtenção da geração T0, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação para a obtenção de sementes (geração F1). As sementes foram germinadas na presença de canamicina (Figura 1.6. A). Na geração F1 a taxa de germinação e sobrevivência foi de 3:1 para todos os eventos, o que corresponde a segregação do tipo mendeliana (dados não mostrados). Porém, a construção pK7GWIWG2(I) – asp não gerou nenhum evento transformado, mesmo após quatro tentativas de transformação (dados não mostrados).

A genotipagem inicial com o “pool” de plantas germinadas, enraizadas e desenvolvidas, revelou, nos três eventos com a construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, a presença dos fragmentos senso e anti-senso dos três genes (Figura 1.6. B e C), confirmando a integração completa no genoma de *N. tabacum* da construção necessária para expressão do RNA dupla-fita (dsRNA). Na avaliação da planta controle SR1-NT (não transformada) nenhum fragmento foi observado (Figura 1.6 C). Nos eventos transformados com as construções pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl, os fragmentos senso e anti-senso também foram detectados normalmente, confirmando a integração da construção no genoma do tabaco (figura 4.6. A e B).

A transcrição dos dsRNAs nos três eventos contendo a construção para silenciar as três proteases ao mesmo tempo, e as proteases serínica e cisteínica em eventos com construções para dsRNA destas proteases isoladamente, foi analisada e confirmada por RT-PCR para detectar a presença do íntron do vetor pK7GWIWG2(I) (Figuras 1.6. B e 1.7. A), uma vez que quando se extrai o RNA total da planta ainda existem moléculas nas quais o intron ainda não foi processado. A realização deste RT-PCR para detectar o intron pré-processado é necessária porque o fragmento do gene não é acessível à amplificação, pois logo ao ser transcrito forma-se uma estrutura secundária com a região complementar (fragmento anti-senso) impedindo a acessibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores [40]. Nos cDNAs dos três eventos para a construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, eventos da construção pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl, foi detectado o fragmento de 145 pb pertencente ao intron do vetor pK7GWIWG2(I) (Figuras 1.6. D e 1.7.C), confirmando a transcrição do intron e, conseqüentemente do dsRNA complementares aos genes-alvo. Conforme o esperado, na planta controle (SR1-NT) não foi verificada a presença de nenhum fragmento amplificado (Figuras 1.6. D e 1.7 C).



#### **1.4.5. Bioensaios dos eventos transformados com as construções pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl contra *M. incognita*.**

Para averiguar o efeito do silenciamento dos genes de proteases dos nematoides foram realizados bioensaios infectando J2 pré-parasíticos nas plantas transformadas com as construções para silenciamento das proteases estudadas.

Inicialmente, sementes dos eventos transformados foram colocadas para germinar em meio contendo canamicina. As plantas que se desenvolveram foram transplantadas para vasos em casa de vegetação e, ao completarem 15 dias após os transplantes foram genotipadas para a presença da fusão dos fragmentos das proteases (Figura 1.8. A, B e C), e para as preteases serínica e cisteínica (Figura 1.9. A e B). As plantas que não apresentavam o fragmento correspondente foram descartadas, e as demais foram utilizadas nos bioensaios (Figura 1.8. D).

Foram inoculados aproximadamente 2000 J2 pré-parasíticos recém-eclodidos em cada planta. Cada tratamento foi composto de seis a dez repetições. Os experimentos foram repetidos duas vezes em períodos diferentes. Aproximadamente seis semanas após a inoculação, as raízes das plantas foram extraídas e processadas individualmente. O número de ovos por grama de raiz, o número de J2 eclodidos por grama de raiz e a taxa de eclosão foram determinados. Todos os valores dos bioensaios foram relativizados em relação ao tratamento controle para normalizar os dados entre as repetições biológicas, e possibilitar a análise estatística. Esta normalização foi necessária por que os dados referentes à infecção de fitonematoides variam muito de um experimento para outro [25], podendo causar erro de interpretação destes dados. Estas variações são inerentes tanto do experimento com nematoides, pois não se sabe quantos realmente penetraram na

raiz, como da técnica de RNAi, pois não se sabe o quanto o nematoide vai ingerir de dsRNA/siRNA [17].

Ao avaliar os dados referentes aos eventos da construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, os dados referentes ao número de ovos se ajustaram melhor ao modelo de distribuição normal com função de ligação identidade. A análise de variância dos desvios foi realizada e a razão de verossimilhança do qui-quadrado (em inglês, “Likelihood Ratio chi-square”) foi significativa ( $LR \chi^2 = 13,052$ ; g.l.=3;  $p= 0,0045$ ). Ao comparar-se o número de ovos por grama de raiz entre o tratamento controle e os eventos transgênicos expressando dsRNA para a fusão a-s-c, foi verificado que este número foi de 29 a 37% menor nos eventos transgênicos que no tratamento controle (Figura 1.10.A), sendo esta diferença significativa pela análise de contrastes ( $p < 0,05$ ). Os eventos transgênicos não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre si (Figura 1.10 A). Estes dados podem indicar que uma ou mais destas proteases podem estar envolvidas no processo de estabelecimento do sítio de alimentação ou na própria nutrição do parasita, já que o número de ovos nos eventos transgênicos foi reduzido.

Os ovos coletados foram eclodidos em água e, a cada 3 dias, os J2 eclodidos foram contabilizados até 45 dias após a coleta dos ovos. Os dados de eclosão dos J2 se ajustaram melhor ao modelo de distribuição gama com função de ligação inversa. A ANODEV foi significativa ( $LR \chi^2 = 89,847$ ; g.l.= 3;  $p= 0,000001$ ), e quando o número de J2 eclodidos do tratamento controle foi comparado com os eventos transgênicos, apenas os eventos 2 e 5 foram significativamente diferentes, apresentando 40 e 56% de redução, respectivamente (Figura 1.10 B) (análise de contrastes,  $p < 0,05$ ). Apesar de o evento 4 ter tido uma redução numérica de 14% em relação ao tratamento controle, esta redução não foi estatisticamente

significativa. Um menor número de J2 eclodidos pode ser resultado de retardamento na eclosão causado por problemas no processo de embriogênese ou no processo de muda, nos quais, uma ou mais destas proteases podem desempenhar função relevante.

Neste mesmo experimento também foi avaliado a taxa de eclosão dos J2 de *M. incognita*, e esta análise visou avaliar os possíveis efeitos do RNAi no processo de eclosão de nematóides. A taxa de eclosão foi determinada como o número total de juvenis J2 eclodidas dividido pelo número inicial de ovos. Todos os valores dos eventos transgênicos foram relativizados em relação ao tratamento controle que consistia da planta não transformada (NT). Os dados da taxa de eclosão se ajustaram melhor ao modelo com distribuição gama com função de ligação inversa. A ANODEV foi significativa (LR  $\chi^2 = 16,985$ ; g.l.= 3;  $p= 0,0007$ ), e apesar disto, apenas o evento 5 apresentou diferença significativa (análise de contraste,  $p < 0,05$ ), com uma redução de 27% em relação ao controle (Figura 1.10 C). Os eventos 2 e 4 não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento controle. Uma menor taxa de eclosão pode ser resultado de problemas na viabilidade dos ovos, que seria decorrente de alterações na embriogênese provocadas pela diminuição de expressão das proteases alvo.

Ao avaliar os dados referentes às construções pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl, os dados referentes ao número de ovos se adequaram melhor ao modelo com distribuição gama e função de ligação inversa, e a ANODEV foi significativa (LR  $\chi^2 = 11,266$ ; g.l.= 2;  $p= 0,0035$ ). Quando se comparou os tratamentos RNAi com o tratamento controle, foi observado que apenas o evento com a construção para silenciar o gene *Mi-cpl-1* obteve uma redução significativa (Figura 1.10 D) de aproximadamente 44% (análise de contraste,  $p < 0,05$ ). Isto pode

ser indício de que a protease cisteínica, mesmo tendo uma provável menor expressão em fêmeas, desenvolva função de digestão de proteínas para nutrição do nematoide.

Os valores relativos ao número de J2 eclodidos se ajustaram melhor ao modelo com distribuição gama e função de ligação inversa. A ANODEV foi significativa com LR  $\chi^2 = 92,821$  (g.l.= 2;  $p= 0,000001$ ) e tanto o evento para silenciar *Mi-ser-1* como o evento para *Mi-cpl-1* obtiveram reduções significativas de 48 e 49%, respectivamente (Figura 1.10 E), no número de J2 eclodidos por grama de raiz (análise de contraste,  $p < 0,05$ ). Isto pode indicar que as proteases serínica e cisteínica tem função importante na eclosão dos J2, podendo atuar tanto na formação do ovo na fêmea, na embriogênese e até na muda.

Quando se avaliou a taxa de eclosão dos J2 em relação ao tratamento controle, foi observado que os dados se adequaram melhor ao modelo com distribuição gama e função de ligação inversa, e a ANODEV foi significativa (LR  $\chi^2 = 18,757$ ; g.l.= 2;  $p= 0,002$ ). No entanto, as reduções obtidas na taxa de eclosão nos eventos expressando dsRNA para as proteases serínica e cisteínica (Figura 1.10 F) não foram significativas (análise de contraste,  $p < 0,05$ ). Estes dados podem indicar que o silenciamento destas proteases serínica e cisteínica não tem relação com a diminuição da taxa de eclosão observada no evento pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c 5, e provavelmente a protease aspártica pode ser responsável por algum processo chave na formação do ovo ou do embrião.

#### **1.4.6. Análise da expressão dos transcritos das proteases *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* em ovos e J2 recuperados de plantas transgênicas expressando dsRNA para os genes alvo .**

Para analisar a possível alteração no acúmulo de transcritos na progênie de nematóides causado pela ingestão de dsRNA e siRNA, o RNA total foi extraído dos ovos e dos J2 eclodidos originários de fêmeas que se alimentaram nos eventos RNAi e controle. Este RNA foi utilizado para realização de qRT-PCR e os dados foram obtidos a partir de dois experimentos idênticos com três repetições cada.

Ao avaliar o acúmulo de RNA em ovos coletados das raízes dos eventos para a construção pK7GWIWG2(l) – fusão a-s-c, foi observado que apenas no gene *Mi-cpl-1* houve redução significativa de transcritos, nos eventos 2 e 5 ( $p < 0,05$ ) (Figura 1.11.A). A redução no evento 4 não foi significativa. Quando se avaliou o acúmulo de transcrito dos genes *Mi-asp-1* e *Mi-ser-1* não foi observada nenhuma diferença significativa (Figura 1.11.A). Estes dados podem indicar uma correlação entre o silenciamento da protease *Mi-cpl-1* e os efeitos fenotípicos observados, mas não excluem a possibilidade de correlação do silenciamento das proteases aspártica e serínica, uma vez que o silenciamento destas proteases pode ter ocorrido em estágios anteriores (J3, J4 ou fêmea).

Entretanto ao avaliar o acúmulo de RNA nos J2 eclodidos, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na quantidade de transcrito do gene *Mi-asp-1* (Figura 1.11.B) variando de 1,5 a 3,2 vezes em relação aos J2 oriundos do tratamento controle (não transformado). Quando se avaliou o gene *Mi-cpl-1*, também em um evento (5) os J2 apresentaram aumento de transcrito de quase 4 vezes (Figura 1.11.B) em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) e os demais não apresentaram diferença significativa, sendo os acúmulos iguais ao do controle. Entretanto, não foi possível

detectar de forma significativa o acúmulo de transcritos do gene *Mi-ser-1* em J2 (Figura 1.11.B), devido, provavelmente à baixa taxa de expressão deste gene neste estágio (Figura 1.2. B) e ao fato de que a quantidade de RNA total obtido neste experimento foi muito menor do que no experimento do item 4.1, onde o número de larvas J2 foi maior, já que foram extraídos de tomateiros com raízes mais desenvolvidas do que as de tabaco.

Quando se avaliou o acúmulo de RNA para os ovos obtidos do evento transformado com a construção pK7GWIWG2(I) – cpl foi observada diferença significativa para o gene *Mi-cpl-1* ( $p < 0,05$ ) (Figura 1.11.C), não havendo diferença do acúmulo em J2 quando comparado com o tratamento controle (Figura 1.11.D). O acúmulo de transcrito do gene *Mi-ser-1* dos ovos obtidos do evento transformado com a construção pK7GWIWG2(I) – ser não foi diferente do acúmulo dos ovos do tratamento controle (Figura 1.11.C), e em J2, como já relatado no parágrafo anterior, não foi possível detectar o acúmulo do gene *Mi-ser-1* tanto no tratamento com dsRNA como no tratamento controle (Figura 1.11.D).

#### **1.4.7. Análise da virulência dos J2 recuperados dos eventos transgênicos expressando dsRNA para as proteases alvo de RNAi**

Para analisar se a possibilidade de além dos efeitos descritos na geração parental, a exposição ao dsRNA acarretaria também efeitos na geração descendente destas fêmeas que se alimentaram nas plantas transformadas, aproximadamente 800 J2 oriundos dos ovos dessas fêmeas foram inoculados em plantas não transformadas (SR1-NT) e a capacidade de iniciar o processo de infecção e desenvolver o parasitismo foi analisado.

Foram utilizadas 5-6 plantas para cada tratamento (eventos transgênicos e controle NT), e o experimento foi repetido duas vezes em datas diferentes. Para avaliar a capacidade de infecção destes nematoides foi contabilizado o número de galhas e o número de massas de ovos para avaliar a capacidade de desenvolvimento e consequente maturação do nematoide. Todos os dados dos dois experimentos foram relativizados ao tratamento controle para contornar o problema da variabilidade inerente já citada anteriormente. Como nos experimentos com as plantas transgênicas, os dados deste foram avaliados estatisticamente utilizando a análise por modelos lineares generalizados (MLG).

Os dados referentes ao número de galhas por planta dos J2 oriundos dos eventos para silenciamento das três proteases numa mesma construção se ajustaram melhor ao modelo com distribuição normal função de ligação identidade. Porém a ANODEV não foi significativa (LR  $\chi^2 = 3,22$ ; g.l.= 3;  $p= 0,358$ ) e, conseqüentemente, os tratamentos não obtiveram nenhuma diferença pela análise de contrastes (Figura 1.12. A). Todavia, o número de massas de ovos para os eventos desta construção se adequaram melhor ao modelo com distribuição gama e função de ligação inversa com LR  $\chi^2 = 14,75$  (g.l.= 3;  $p= 0,002$ ). Ao se avaliar as diferenças entre os tratamentos, foi observado que o número de massas de ovos dos J2 oriundos dos eventos 2 e 4 da construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c produziram menos massas de ovos em relação aos J2 controle (Figura 1.12.B). Os J2 do evento 2 produziram 32% menos massas de ovos que o controle e os do evento 4, 47% menos (análise de contraste,  $p < 0,05$ ).

Em seguida, a infecção e desenvolvimento dos J2 oriundos dos eventos transformados com as construções pK7GWIWG2(I) – ser e cpl, foram avaliados. Os dados do número de galhas se acomodaram melhor ao modelo com distribuição gama com função de ligação inversa. A ANODEV foi significativa (LR  $\chi^2 = 11,700$ ;

g.l.= 2;  $p= 0,003$ ) e os J2 oriundos do evento com a construção pK7GWIWG(I) – cpl produziram menos galhas do que no tratamento controle (Figura 1.12.C), com uma redução significativa de 46% (análise de contraste,  $p < 0,05$ ). Considerando o número de massas de ovos, estes dados se ajustaram melhor ao modelo com distribuição normal com função de ligação identidade. A ANODEV foi significativa (LR  $\chi^2 = 7,298$ ; g.l.= 2;  $p= 0,026$ ) e novamente os J2 oriundos do evento com a construção pK7GWIWG(I) – cpl apesar de terem se desenvolvidos até o estágio de fêmea, produziram menos massas de ovos que os J2 do tratamento controle (figura 1.12. D), com uma redução significativa de 36% (análise de contraste,  $p < 0,05$ ). A avaliação do número de galhas por planta e de massas de ovos das plantas inoculadas com os J2 oriundos do evento com a construção pK7GWIWG2(I) – ser não mostrou nenhuma diferença com os dados do tratamento controle. Ao se melhor interpretar os dados pode-se verificar que o silenciamento parcial do gene *Mi-cpl-1* teve um efeito duradouro desde a geração parental, resultando em menor número de ovos, J2 eclodidos e taxa de eclosão; e também afetou a virulência da progênie resultando em menor número de galhas e de massas de ovos. Apesar de o silenciamento do gene *Mi-ser-1* ter provocado apenas a redução de J2 eclodidos na geração parental, os J2 oriundos do evento transformado com a construção pK7GWIWG2(I) – ser não tiveram sua virulência afetada.



## 1.5. DISCUSSÃO

Recentemente, com a publicação do genoma de *M. incognita* [6] foi descoberto que este nematoide possui uma gama de proteases de todas as classes já descritas na literatura [5]. Além das funções já conhecidas como a digestão ordinária de proteínas, e de participarem de várias cascatas metabólicas, especialmente em fitonematoides as proteases podem funcionar também como moléculas efetoras de parasitismo [11], possivelmente degradando proteínas do hospedeiro no apoplasto da planta como sugerido por Vieira e colaboradores [11] baseado em mecanismo semelhante ao que ocorre em *Pseudomonas syringae*, uma bactéria patogênica às plantas, que libera proteases na célula vegetal para suprimir vias de defesa da planta [41]. Além disso, as proteases de nematoides podem estar envolvidas na reprodução e no processo de embriogênese dos próprios parasitas [42].

Com base nessas possíveis funções biológicas desempenhadas por proteases, tanto na iniciação do parasitismo, desenvolvimento e manutenção dos sítios de alimentação, e até no estágio reprodutivo, foi estudada a importância de três proteases de *M. incognita*: uma aspartil protease, uma serina protease e cisteína protease tipo catepsina L.

### 1.5.1. O perfil de expressão das proteases pode dar indícios das suas prováveis funções em *M. incognita*

Ao se investigar o perfil de acúmulo de transcritos das proteases por PCR quantitativo (qRT-PCR) foi verificado que elas possuem diferenças de acúmulo entre os diferentes estágios.

Para a protease aspártica foi observado que o maior nível de acúmulo entre os estágios estudados foi em J2 e o menor em J4/Fêmea. Este resultado foi diferente do observado por Fragoso e colaboradores [10] que observaram por RT-

PCR maior acúmulo em fêmeas. No entanto, sabe-se que a técnica de qRT-PCR possui uma sensibilidade superior quando comparada ao RT-PCR comum e, além disso, os dados obtidos no presente trabalho foram estatisticamente significativos. Ademais, Fragoso e colaboradores [10] também detectaram nesta protease a sequência predita do peptídeo sinal, indicando que a proteína é, provavelmente, exportada para meio extracelular. Estes são indícios de que esta protease aspártica pode estar envolvida no processo de infecção e estabelecimento do sitio ativo, já que o nematoide no estágio J2 não se alimenta [39], indicando que nesta fase esta enzima não tem função digestiva.

A protease serínica apresentou um perfil completamente diferente da aspártica, já que os transcritos foram detectados em maior quantidade em ovo e J4/fêmea, sendo pouco detectados em J2, sendo o acúmulo de seus transcritos nesta fase, 36 vezes menor do que em ovo. Resultados semelhantes foram obtidos por Fragoso e colaboradores [9], os quais não detectaram o fragmento do gene *Mi-ser-1* por “Northern blot” no cDNA de J2. No entanto neste mesmo trabalho [9] os autores verificaram que em fêmeas, a protease serínica é mais expressa do que em ovo, o que não se repetiu no presente trabalho. No entanto, foi verificado que em J4/fêmea há maior acúmulo de transcritos *Mi-ser-1* do que em J2, isto pode ser indício de que ela seja utilizada durante a alimentação dos estágios sedentários (J4/fêmea) na célula gigante para digerir proteínas dos sítios de alimentação para obtenção de aminoácidos livres e energia. Nesta fase, a protease serínica apresentaria função digestiva na alimentação e obtenção de energia pela fêmea sedentária, em contraste à protease aspártica, que provavelmente possui função de estabelecimento do processo infectivo, conforme discutido anteriormente.

O perfil de expressão da protease *Mi-cpl-1* revelou que as quantidades de transcritos em ovos e J2 foram estatisticamente iguais. Entretanto, em J4/fêmea o

acúmulo foi cinco vezes menor do que em ovos. Estes resultados foram divergentes dos que foram encontrados por Neveu e colaboradores [7], que reportaram baseados em experimentos de RT-PCR, que este gene seria mais expresso em J2 do que em fêmea e em ovo. Já Shingles e colaboradores [8] observaram também por RT-PCR que não há diferença de expressão desta protease cisteínica entre os estágios J2 e Fêmea. Como já foi mencionado, a precisão de quantificação do qRT-PCR é superior a obtida regularmente por RT-PCR comum, o que faz os dados obtidos neste trabalho terem maior sensibilidade e representarem com mais precisão o que se observaria na natureza. Apesar de ter sido predito um peptídeo sinal para esta enzima e provavelmente funcionar extracelularmente, foi provado por hibridização *in situ*, que ela é expressa, tanto em J2 [7] como em Fêmea [8], no trato intestinal do nematoide, e conseqüentemente pode ter função digestiva.

#### **1.5.2. Os nematoides que infectaram plantas contendo construções para silenciamento das proteases tiveram sua fecundidade e viabilidade dos ovos reduzidos**

O sucesso do parasitismo de fitonematoides, como *M. incognita*, depende significativamente do uso eficiente do arsenal de moléculas de parasitismo disponíveis para contornar as defesas da planta e manter os sítios de alimentação. Considerando a função relevante que os genes envolvidos no parasitismo provêm para a sobrevivência dos fitonematoides, este estudo foi realizado para investigar a possibilidade de redução dos transcritos dos genes de três proteases simultaneamente e individualmente, de forma a reduzir a taxa de sucesso de parasitismo deste nematoide no seu hospedeiro.

Um dos objetivos específicos deste trabalho foi testar uma forma de validar em larga escala, possíveis efeitos aditivos, colocando na mesma construção, em tandem, sequências complementares para as proteases aspártica, serínica e

cisteínica. As proteases aspárticas nunca tinham sido validadas em nenhum sistema para silenciamento de genes em fitonematoides. No entanto, uma protease cisteínica muito semelhante a que foi estudada neste trabalho havia sido validada pelo método de “soaking” [8], no qual nematóides são alimentados diretamente com dsRNA. Possivelmente, estas duas sequências pertencem ao mesmo gene e as pequenas diferenças existentes tanto na sequência de DNA como na de aminoácidos é, provavelmente, resultado de polimorfismo entre populações diferentes [8]. Todavia, é válido salientar que este gene nunca havia sido validado *in planta*.

Inicialmente, nos eventos com a construção pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c foi obtida uma redução significativa no número de ovos por grama de raiz que variou de 29 – 37%. Já no evento com a construção pK7GWIWG2(I)- cpl a redução foi de 44%, e no evento com a construção pK7GWIWG2(I)-ser a redução de 21% não foi significativa. Silenciamento de genes de fitonematoides *in planta* que acarretaram na redução de ovos por grama de raiz já haviam sido relatados por Steeves e colaboradores [43], onde o silenciamento parcial da principal proteína do esperma (msp) acarretou numa menor fecundidade dos machos *H. glycines*, e, conseqüentemente, menor número de ovos com uma redução de até 68%. O silenciamento de proteínas ribossomais por Li e colaboradores [27] também acarretou no decréscimo da fecundidade com redução do número de ovos por grama de raiz de até 87%. No entanto, no caso das proteases o evento que silenciava apenas o gene *Mi-cpl-1* obteve uma redução maior (44%) que todos os três eventos e devido a isto, o efeito desta redução de fecundidade foi provocado senão totalmente, pelo menos em maior parte, pelo silenciamento do gene *Mi-cpl-1*. Shingles e colaboradores [8] já haviam evidenciado os efeitos do silenciamento do gene *Mi-cpl-1* através do método de “soaking”, que foram a redução do tamanho e da circunferência das fêmeas que foi provavelmente efeito da deficiência nutricional

provocada pela baixa expressão da enzima Mi-Cpl-1. Esta deficiência nutricional também, poderia provocar a redução do número de ovos evidenciada neste trabalho.

A redução do número de J2 eclodidos em dois eventos pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c, foi também observada nos eventos pK7GWIWG2(I)-ser e pK7GWIWG2(I)-cpl, confirmando que o silenciamento destes genes de alguma forma atrasou a eclosão dos J2. Fanelli e colaboradores [44] já haviam observado este fenótipo quando silenciaram parcialmente o gene quitina sintase através de “soaking” dos ovos de *Meloidogyne artiellia*.

Foi também observado que em um dos eventos pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c a relação entre os J2 eclodidos e o número inicial de ovos foi reduzida significativamente, indicando possivelmente efeito também na viabilidade dos ovos que pode ter sido provocado por alterações na embriogênese. O silenciamento do gene Ce-CPL-1 [42] em *C. elegans* através de “soaking” resultou em efeitos na embriogênese resultando em ovos inviáveis. No entanto, nos eventos pK7GWIWG2(I)-ser e pK7GWIWG2(I)-cpl este efeito não foi observado, indicando que o mesmo pode ser decorrente do silenciamento do gene *Mi-asp-1*. Porém, não foi possível gerar um evento com a construção pK7GWIWG2(I)-asp.

Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar que existe a possibilidade de que as proteases Mi-asp1, Miser1 e MiCpl-1 estão também envolvidas na embriogênese e/ou no processo de muda de *M. incognita*.

### **1.5.3. O silenciamento dos genes das proteases passa para a progênie de *M. incognita* sendo detectado nos ovos, mas não em J2**

A quantificação do efeito do silenciamento na expressão do RNA mensageiro de cada gene foi feita por PCR em tempo real. Os estágios de ovo e J2 da progênie oriunda dos nematoides que infectaram as plantas expressando as construções para silenciamento das proteases foram escolhidos para verificar se o efeito do

silenciamento era efetivo até o final do ciclo do nematoide e se o efeito do silenciamento seria transmitido para a progênie. Quando os dados foram avaliados, verificou-se que apenas o gene de *Mi-cpl-1* estava com níveis significativos de redução de transcrito, em comparação com o tratamento controle, no estágio de ovo, tanto para os ovos oriundos dos eventos pK7GWIWG2(I) - fusão a-s-c como pK7GWIWG2(I) - cpl. O efeito a longo prazo do RNAi já havia sido evidenciado em cistos de *H. glycines* [27] onde os genes envolvidos em reprodução e “fitness” do nematoide continuavam silenciados 5 semanas após a inoculação. Os genes *Mi-asp-1* e *Mi-ser-1* não tiveram seu nível de expressão alterado em ovo, mas isso não quer dizer que estes genes não foram silenciados, uma vez que, neste trabalho, não foi avaliado o silenciamento inicial que ocorre nos primeiros dias após a infecção [8, 23]. Os dados de silenciamento em ovo corroboram os resultados fenotípicos e, provavelmente, o efeito fenotípico é causado principalmente pelo efeito do silenciamento de *Mi-cpl-1*.

No entanto, foi na avaliação da expressão dos genes das proteases no estágio J2 da progênie que os resultados foram mais evidentes. Ao invés de se observar silenciamento ou nenhuma mudança na expressão dos genes, curiosamente os J2 oriundos dos três eventos pK7GWIWG2(I) - fusão a-s-c apresentaram um aumento significativo da expressão do gene *Mi-asp-1*, enquanto o evento 5 da mesma construção também apresentou aumento significativo da expressão do gene *Mi-cpl-1*. Todavia, no evento da construção pK7GWIWG2(I) - cpl não foi verificada diferença estatística para a expressão do gene *Mi-cpl-1*. Este é o primeiro relato de aumento de expressão de gene após este ter sido alvo de silenciamento *in planta*. Este efeito já foi observado por Bakhietia e colaboradores [45] quando estes avaliaram o silenciamento de dois genes de *H. glycines*, simultaneamente, pela técnica de “soaking” e um dos genes aumentou a expressão

ao invés de diminuir como aconteceu quando ele foi silenciado isoladamente. Os autores deste trabalho argumentam que este fato ocorreu, provavelmente, devido a amplificação de RNA (RNAa) depois de tratamento com dsRNA. Porém este tipo de efeito só foi detectado até hoje em células de mamíferos e quando o alvo do dsRNA era o promotor do gene [46, 47].

#### **1.5.4. Os efeitos fenotípicos do RNAi em fitonematoides podem se prolongar para geração seguinte mesmo após a reestabilização da expressão dos transcritos**

Para avaliar se o efeito do RNAi se prolongaria para a próxima geração infectante sem a indução de novo silenciamento, os nematoides oriundos dos eventos pK7GWIWG2(I) - fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl foram inoculados em plantas não transgênicas (SR1-NT). Mesmo com a expressão dos genes estabilizada ou até aumentada, os nematoides oriundos dos eventos RNAi não tiveram o mesmo sucesso ao infectar plantas não transformadas. O número de galhas induzidos por J2 oriundos do evento pK7GWIWG2(I) – cpl e principalmente o número de massas de ovos de fêmeas desenvolvidas a partir de J2 oriundos dos eventos pK7GWIWG2(I) - fusão a-s-c 2 e 5, e pK7GWIWG2(I) - cpl foram reduzidos significativamente. Dubreuil e colaboradores [31] reportaram que J2 oriundos de plantas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas com o vírus TRV para silenciamento do gene da calreticulina (TRV:: *CRT*) pelo método de VIGS, produziam menos galhas quando eram inoculados em tomates NT. No entanto, estes J2 tinham níveis de expressões do gene de calreticulina menores que os do tratamento controle (TRV:: *GFP*).

Novamente, os dados foram mais significativos nos J2 oriundos do evento pK7GWIWG2(I) – cpl, confirmando a importância do gene *Mi-cpl-1* para ciclo de vida de *M. incognita*. Este é primeiro relato em *M. incognita*, de que mesmo após a

estabilização da expressão de um gene na progênie recuperada, os efeitos fenotípicos persistem, afetando o número de galhas e o de massas de ovos.

#### **1.5.5. O silenciamento de genes simultaneamente pode ser uma estratégia tanto para validação de efeitos sinérgicos e aditivos como para utilizar vários genes alvos eficientes para controle de fitonematoides**

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se observar que o método de validação de genes simultâneos pode ser válido desde que se quantifique a expressão de transcrito de cada gene por qRT-PCR. A metodologia se baseia nos seguintes passos: caso se obtenha algum resultado fenotípico relevante partir-se-ia para avaliar o silenciamento de cada gene isoladamente e identificar qual(is) gene(s) estaria(m) provocando o efeito fenotípico. Poder-se-ia, então, utilizar um gene alvo com fenótipo de RNAi já determinado na mesma construção, fusionado com os demais genes, para ser utilizado como controle do experimento. Este é o primeiro relato de tentativa de silenciamento de três genes para fitonematoides *in planta* onde os dsRNAs dos genes foram produzidos fusionados a partir de uma mesma construção.

Esta metodologia também pode ser utilizada para silenciar, numa mesma construção, mais de um gene com fenótipo já conhecido, na tentativa de se obter efeitos sinérgicos ou aditivos, ou até mesmo utilizar numa mesma construção genes alvos para diferentes espécies de fitonematoides que ataquem uma mesma cultura.

No entanto, se existe a chance de se ter um possível efeito aditivo ou sinérgico colocando mais de uma sequência numa mesma construção para silenciar vários alvos, também existe a chance de acontecer o contrário, e provocar uma diminuição do silenciamento se comparado com o silenciamento dos genes isoladamente. Para exemplificar a possibilidade desses possíveis efeitos tem-se dois trabalhos disponíveis na literatura com tentativas de combinação de RNAi para



nematóides: primeiro, Bakhetia e colaboradores [45] já haviam estudado efeito de combinação de mais de um gene para silenciamento por RNAi em *H. glycines* utilizando o método de “soaking” e observaram que quando utilizavam o RNAi combinado para dois genes o efeito de silenciamento era menor do que quando o alvo era apenas um dos genes. Já Charlton e colaboradores [26] observaram que quando utilizaram linhagens *A. thaliana* contendo duas construções distintas para silenciamento, oriundas de cruzamento, numa mesma planta o efeito do silenciamento foi aditivo, sendo maior do que o provocado pelas linhagens parentais contendo as construções isoladas. Entretanto, nesses dois casos, não se utilizou a metodologia proposta no presente trabalho.

## 1.6. CONCLUSÕES

- O perfil de acúmulo de transcritos das proteases de *M. incognita* forneceu indícios iniciais de que estas enzimas podem estar envolvidas vários processos como o de infecção, embriogênese e muda do nematoide;

- A fecundidade das fêmeas e a viabilidade dos ovos de *M. incognita* foram reduzidas quando estes infectaram plantas contendo, principalmente, a construção para silenciamento da protease cisteínica e para a fusão de proteases;

- Ocorreu uma redução do acúmulo de transcritos da protease cisteínica nos ovos (progênie), mas não nos J2 eclodidos;

- A virulência da progênie de *M. incognita* recuperada dos eventos transgênicos expressando dsRNA para silenciar as proteases foi afetada, resultando em menor número de ovos e de massas de ovos, principalmente nos J2 oriundos das plantas pK7GWIWG2(I) – asc e cpl;

## 1.7. REFERÊNCIAS

[1] D.J. Chitwood, Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, *Pest Manag Sci*, 59 (2003) 748-753.

[2] D.L. Trudgill, V.C. Blok, Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens, *Annu Rev Phytopathol*, 39 (2001) 53-77.

[3] E.L. Davis, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, T.J. Baum, Parasitism proteins in nematode-plant interactions, *Curr Opin Plant Biol*, 11 (2008) 360-366.

[4] J. Tort, P.J. Brindley, D. Knox, K.H. Wolfe, J.P. Dalton, Proteinases and associated genes of parasitic helminths, *Adv Parasitol*, 43 (1999) 161-266.

[5] P. Castagnone-Sereno, E. Deleury, E.G. Danchin, L. Perfus-Barbeoch, P. Abad, Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes, *Genomics*, 97 (2011) 29-36.

[6] P. Abad, J. Gouzy, J.M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E.G. Danchin, E. Deleury, L. Perfus-Barbeoch, V. Anthouard, F. Artiguenave, V.C. Blok, M.C. Caillaud, P.M. Coutinho, C. Dasilva, F. De Luca, F. Deau, M. Esquibet, T. Flutre, J.V. Goldstone, N. Hamamouch, T. Hewezi, O. Jaillon, C. Jubin, P. Leonetti, M. Magliano, T.R. Maier, G.V. Markov, P. McVeigh, G. Pesole, J. Poulain, M. Robinson-Rechavi, E. Sallet, B. Segurens, D. Steinbach, T. Tytgat, E. Ugarte, C. van Ghelder, P. Veronico, T.J. Baum, M. Blaxter, T. Bleve-Zacheo, E.L. Davis, J.J. Ewbank, B. Favery, E. Grenier, B. Henrissat, J.T. Jones, V. Laudet, A.G. Maule, H. Quesneville, M.N. Rosso, T. Schiex, G. Smant, J. Weissenbach, P. Wincker, Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Nat Biotechnol*, 26 (2008) 909-915.

[7] C. Neveu, P. Abad, P. Castagnone-Sereno, Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63 (2003) 159-165.

[8] J. Shingles, C.J. Lilley, H.J. Atkinson, P.E. Urwin, *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi, *Exp Parasitol*, 115 (2007) 114-120.

[9] R.R. Fragoso, J.A. Batista, O.B. Neto, M.F. Grossi de Sa, Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *Exp Parasitol*, 110 (2005) 123-133.

[10] R.R. Fragoso, I.T. Lourenco, J.A. Batista, O.B. Oliveira-Neto, M.C. Silva, T.L. Rocha, M.V. Coutinho, M.F. Grossi-de-Sa, *Meloidogyne incognita*: molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase, *Exp Parasitol*, 121 (2009) 115-123.

[11] P. Vieira, E.G. Danchin, C. Neveu, C. Crozat, S. Jaubert, R.S. Hussey, G. Engler, P. Abad, J. de Almeida-Engler, P. Castagnone-Sereno, M.N. Rosso, The

plant apoplast is an important recipient compartment for nematode secreted proteins, *J Exp Bot*, 62 (2011) 1241-1253.

[12] R.J. Beynon, J.S. Bond, *Proteolytic enzymes: a practical approach*, IRL Press, Oxford university Press Molecular, 1994.

[13] D. Baulcombe, RNA silencing, *Trends Biochem Sci*, 30 (2005) 290-293.

[14] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391 (1998) 806-811.

[15] M.N. Rosso, J.T. Jones, P. Abad, RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes, *Annu Rev Phytopathol*, 47 (2009) 207-232.

[16] P.E. Urwin, C.J. Lilley, H.J. Atkinson, Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference, *Mol Plant Microbe Interact*, 15 (2002) 747-752.

[17] M.N. Rosso, M.P. Dubrana, N. Cimbolini, S. Jaubert, P. Abad, Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins, *Mol Plant Microbe Interact*, 18 (2005) 615-620.

[18] G. Huang, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 14302-14306.

[19] G. Huang, R. Dong, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor, *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (2006) 463-470.

[20] G. Dubreuil, E. Deleury, M. Magliano, M. Jaouannet, P. Abad, M.N. Rosso, Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are required for successful development within the host, *Int J Parasitol*, 41 (2011) 385-396.

[21] B.C. Yadav, K. Veluthambi, K. Subramaniam, Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection, *Mol Biochem Parasitol*, 148 (2006) 219-222.

[22] T. Hewezi, P. Howe, T.R. Maier, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, E.L. Davis, T.J. Baum, Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with *Arabidopsis* pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism, *Plant Cell*, 20 (2008) 3080-3093.

[23] N. Patel, N. Hamamouch, C. Li, T. Hewezi, R.S. Hussey, T.J. Baum, M.G. Mitchum, E.L. Davis, A nematode effector protein similar to annexins in host plants, *J Exp Bot*, 61 (2010) 235-248.

[24] V.P. Klink, K.H. Kim, V. Martins, M.H. Macdonald, H.S. Beard, N.W. Alkharouf, S.K. Lee, S.C. Park, B.F. Matthews, A correlation between host-mediated expression

of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*, *Planta*, 230 (2009) 53-71.

[25] A.S. Sindhu, T.R. Maier, M.G. Mitchum, R.S. Hussey, E.L. Davis, T.J. Baum, Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success, *J Exp Bot*, 60 (2009) 315-324.

[26] W.L. Charlton, H.Y. Harel, M. Bakhetia, J.K. Hibbard, H.J. Atkinson, M.J. McPherson, Additive effects of plant expressed double-stranded RNAs on root-knot nematode development, *Int J Parasitol*, 40 (2010) 855-864.

[27] J. Li, T.C. Todd, T.R. Oakley, J. Lee, H.N. Trick, Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe, *Planta*, 232 (2010) 775-785.

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

[29] R.S. Hussey, A.A. Barker, Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. , *Plant Disease Reporter*, 57 (1973) 1025-1028.

[30] T.C. Vrain, A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula, *J Nematol*, 9 (1977) 249-251.

[31] G. Dubreuil, M. Magliano, M.P. Dubrana, J. Lozano, P. Lecomte, B. Favery, P. Abad, M.N. Rosso, Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode, *J Exp Bot*, 60 (2009) 4041-4050.

[32] S. Zhao, R.D. Fernald, Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction, *J Comput Biol*, 12 (2005) 1047-1064.

[33] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, 29 (2001) e45.

[34] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J Mol Biol*, 215 (1990) 403-410.

[35] M. Karimi, D. Inze, A. Depicker, GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation *Trends Plant Sci*, 7 (2002) 193-195.

[36] P. Gallois, P. Marinho, Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens* - expression of heterologous genes in tobacco., in: H. Jones (Ed.) *Plant gene transfer and expression protocols*, Human Press, Totowa, 1995, pp. 38-48.

[37] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures., *Physiol Plant*, 15 (1962) 473-497.

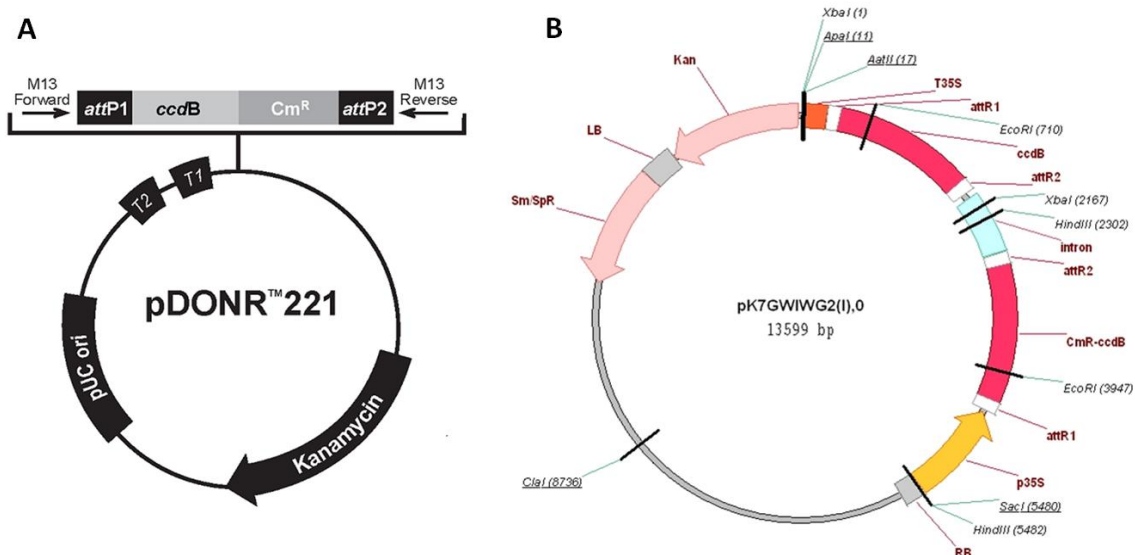
[38] R.D.C. Team, R: A language and environment for statistical computing., in: R.F.f.S. *Computing* (Ed.), Vienna, Austria, 2010.

- [39] U. Wyss, F.M.W. Grundler, A. Munch, The Parasitic Behavior of 2nd-Stage Juveniles of *Meloidogyne-Incognita* in Roots of *Arabidopsis-Thaliana*, *Nematologica*, 38 (1992) 98-111.
- [40] S.V. Wesley, C.A. Helliwell, N.A. Smith, M.B. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green, P.M. Waterhouse, Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants, *Plant J*, 27 (2001) 581-590.
- [41] R.H. Downen, J.L. Engel, F. Shao, J.R. Ecker, J.E. Dixon, A family of bacterial cysteine protease type III effectors utilizes acylation-dependent and -independent strategies to localize to plasma membranes, *J Biol Chem*, 284 (2009) 15867-15879.
- [42] S. Hashmi, C. Britton, J. Liu, D.B. Guiliano, Y. Oksov, S. Lustigman, Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*, *J Biol Chem*, 277 (2002) 3477-3486.
- [43] R.M. Steeves, T.C. Todd, J.S. Essig, H.N. Trick, Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction, *Functional Plant Biology*, 33 (2006) 991-999.
- [44] E. Fanelli, M. Di Vito, J.T. Jones, C. De Giorgi, Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi, *Gene*, 349 (2005) 87-95.
- [45] M. Bakhetia, P.E. Urwin, H.J. Atkinson, Characterisation by RNAi of pioneer genes expressed in the dorsal pharyngeal gland cell of *Heterodera glycines* and the effects of combinatorial RNAi, *Int J Parasitol*, (2008).
- [46] B.A. Janowski, S.T. Younger, D.B. Hardy, R. Ram, K.E. Huffman, D.R. Corey, Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs, *Nat Chem Biol*, 3 (2007) 166-173.
- [47] L.C. Li, S.T. Okino, H. Zhao, D. Pookot, R.F. Place, S. Urakami, H. Enokida, R. Dahiya, Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 17337-17342.

**Tabela 1.1.** Lista de oligonucleotídeos utilizados no capítulo 1.

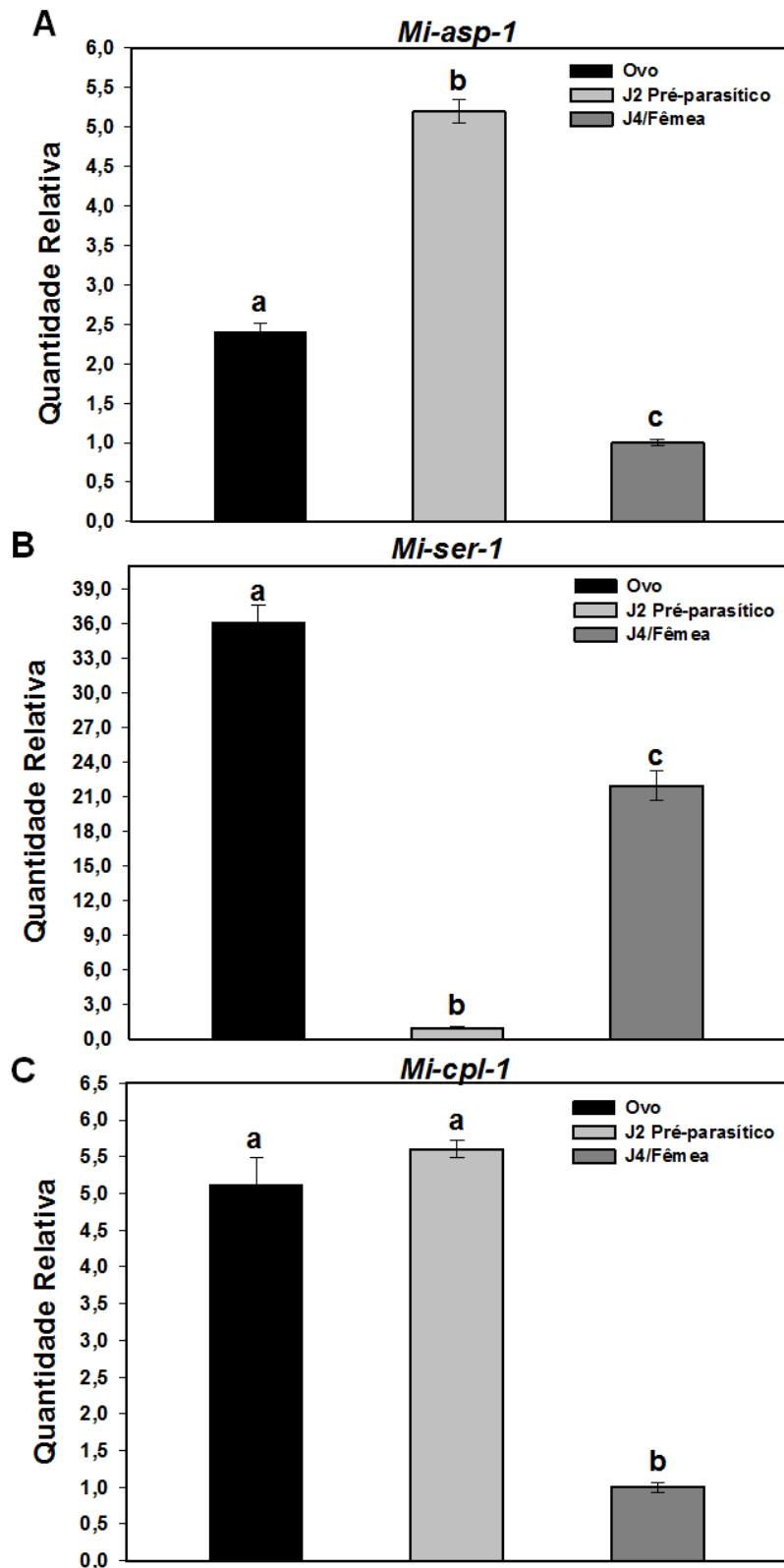
Gene ou região-alvo	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Posição inicial no gene-alvo (pb)	Tamanho do fragmento (pb)	Objetivo
<i>Mi-asp-1</i>	MiASPqPCR F	AATTGGAGGTCATTCATACG	1026	107	qRT-PCR
	MiASPqPCR R	GTGGAAGATCAATTCCCATA	1132		
<i>Mi-ser-1</i>	MiSERqPCR F2	CATTTTCCGACCTTGCACTT	559	157	qRT-PCR
	MiSERqPCR R2	GGTCGGTCATTGAGCAAAC	715		
<i>Mi-cpl-1</i>	MiCISqPCR F	TGTACACTTTGCTTGTGCGAG	31	103	qRT-PCR
	MiCISqPCR R	GAATTTCTTCGAGATCGTTG	133		
<i>Mi-asp-1</i>	Mi-ASP1_GTWY F	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG</u> <b>TCTTTATAGGCCGTTACTACTG</b>	1165	198	Clonagem /detecção em tabaco
	Mi-ASP1_GTWY R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</u> <b>AAGCAATTTCAATAAAATCATCAG</b>	1363		
<i>Mi-ser-1</i>	Mi-SER_GTWY F	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGG</u> <b>AATTTCTGTTATCTGCTGCCAC</b>	326	210	Clonagem/detecção em tabaco
	Mi-SER_GTWY R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</u> <b>TTTTGTTTTATAATAACGAGAGAG</b>	536		
<i>Mi-cpl-1</i>	Mi-CIS_GTWY F	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGG</u> <b>CCAATTTCTGTAGCAATTGATGCC</b>	888	201	Clonagem/detecção em tabaco
	Mi-CIS_GTWY R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG</u> <b>TGGAATATACCCATTTTCTCCCA</b>	1089		
Intron pK7GWIWG2(I)	pK7-Intron-RT-R	ATG GAA ATG ATG AGG TAA GGT TTC	630 (relativo apenas ao intron)	x	RT-PCR em tabaco
Intron pK7GWIWG2(I)	pK7-Intron – F	GAG TAT AAA CTC ATT AAC TAA	104 (relativo apenas ao intron)	145	RT-PCR em tabaco
Intron pK7GWIWG2(I)	Intron_pK7_RV	TGG CAT AGG GGT TTA GAT GC	248 (relativo apenas ao intron)		RT-PCR/detecção fragmento Anti-senso no DNA genômico de tabaco
Intron pK7GWIWG2(I)	Intron_pK7_FW	TAA CTC AGC ACA CCA GAG CA	515 (relativo apenas ao intron)	x	Detecção fragmento Anti-senso no DNA genômico de tabaco

\*Os sítios de recombinação do sistema Gateway estão em itálico e sublinhado.

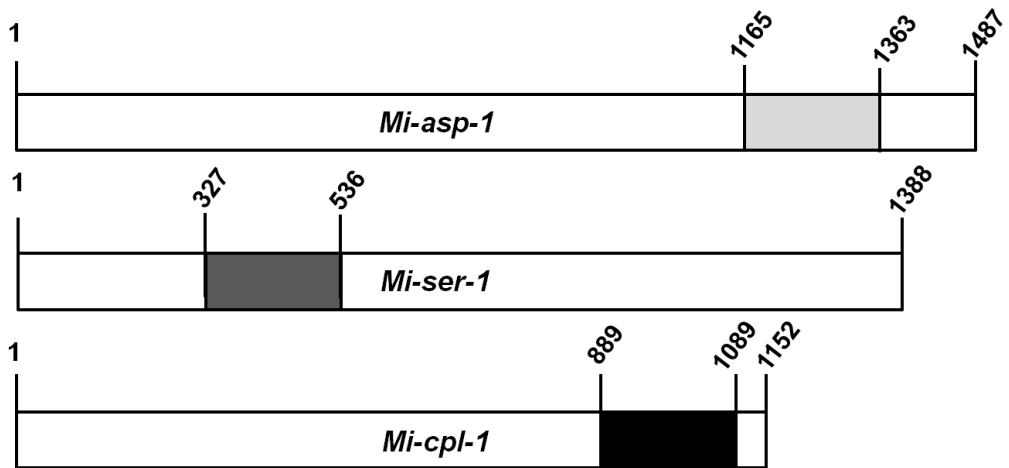


**Figura 1.1.** Mapas dos vetores utilizados para fazer as construções para silenciamento gênico via RNAi utilizando o sistema Gateway® de clonagem por recombinação. **A.** Vetor pDONR™221 utilizado como vetor de entrada; **B.** Vetor pK7GWIWG2(I) utilizado como vetor final binário, para expressão de dsRNA em plantas.

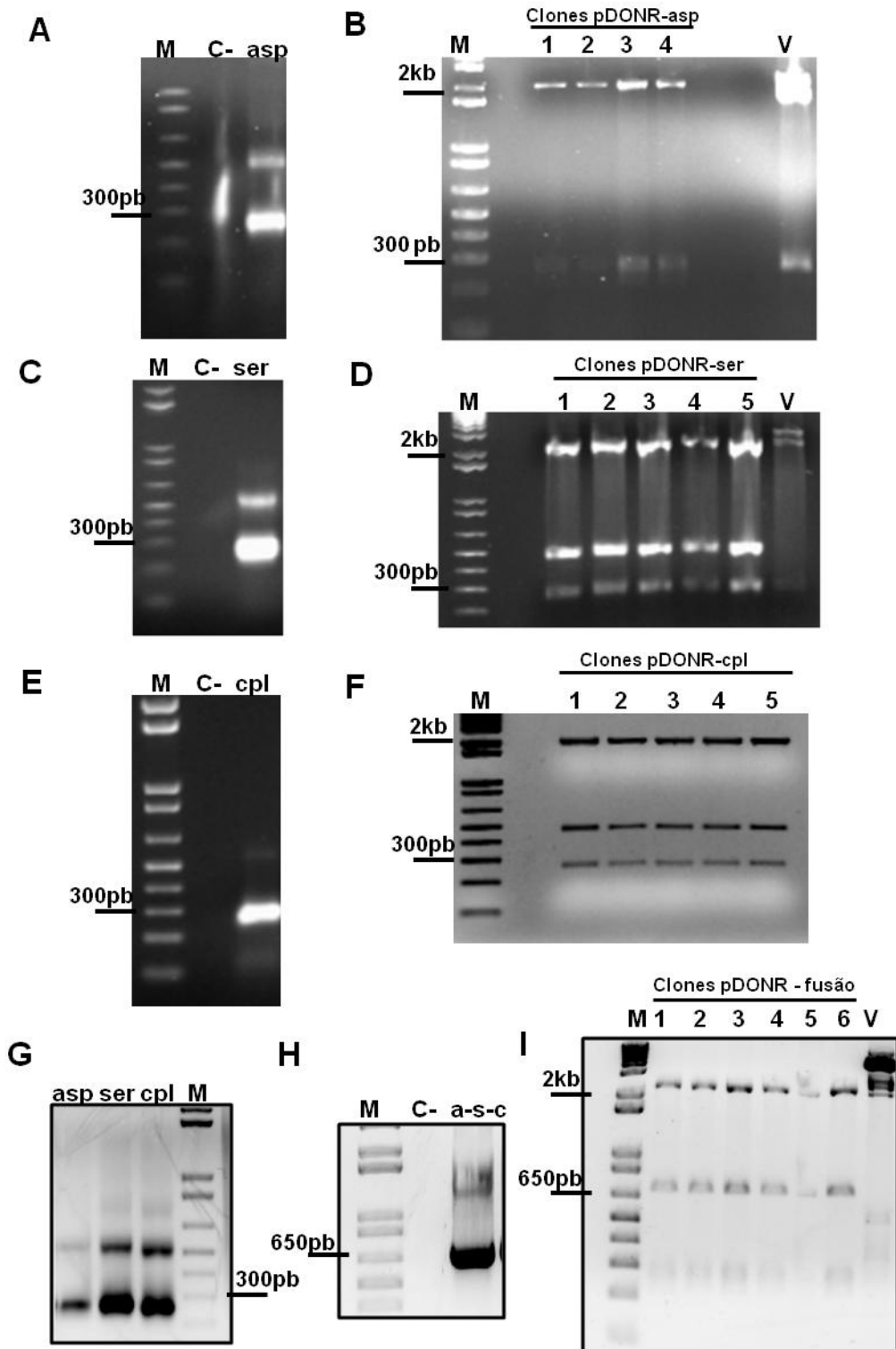




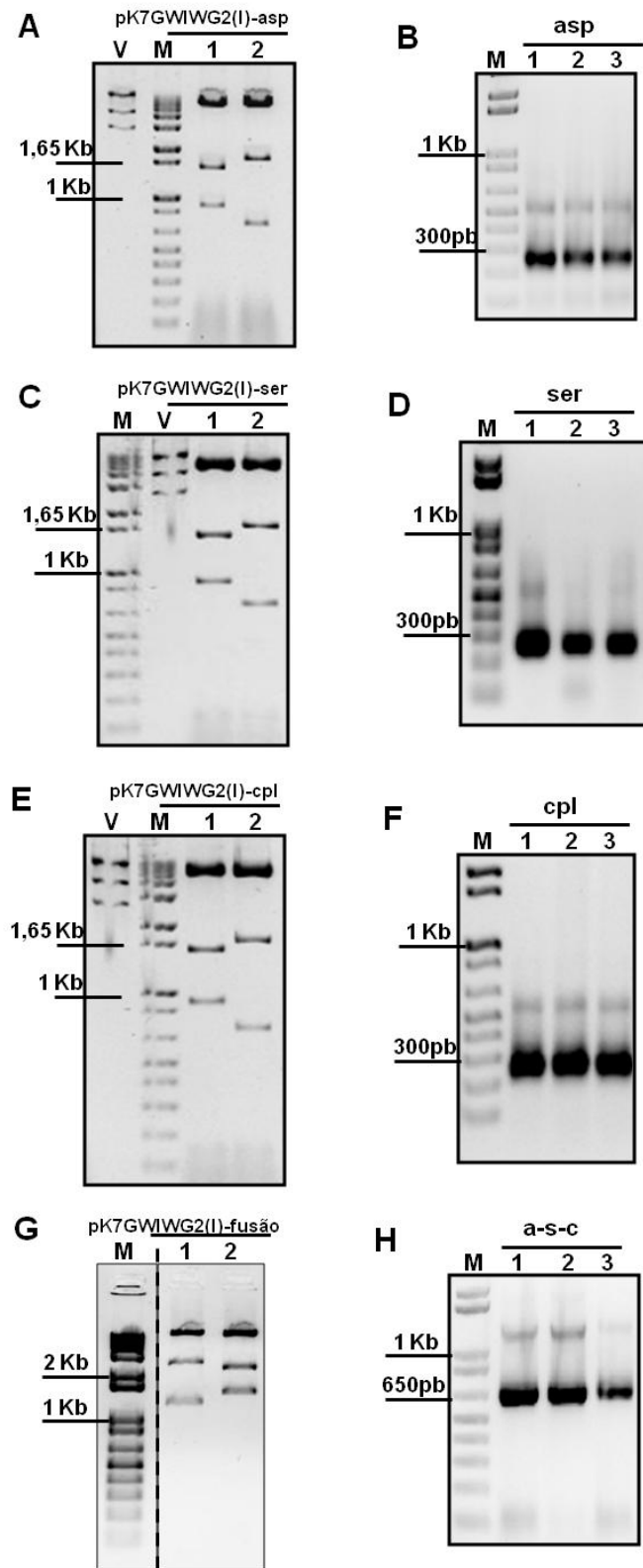
**Figura 1.2.** Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos das proteases *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* em *M. incognita* em três estágios de vida. **A.** Nível relativo de acúmulo de transcrito de *Mi-asp-1* tendo como comparação J4/Fêmea; **B.** Nível relativo de acúmulo de transcrito de *Mi-ser-1* comparando com J2 pré-parasítico; **C.** Nível relativo de acúmulo de transcrito de *Mi-cpl-1* comparando com J4/Fêmea. Médias com letras diferentes diferem entre si pela análise de iterações, com  $p < 0,05$  (REST 2009).



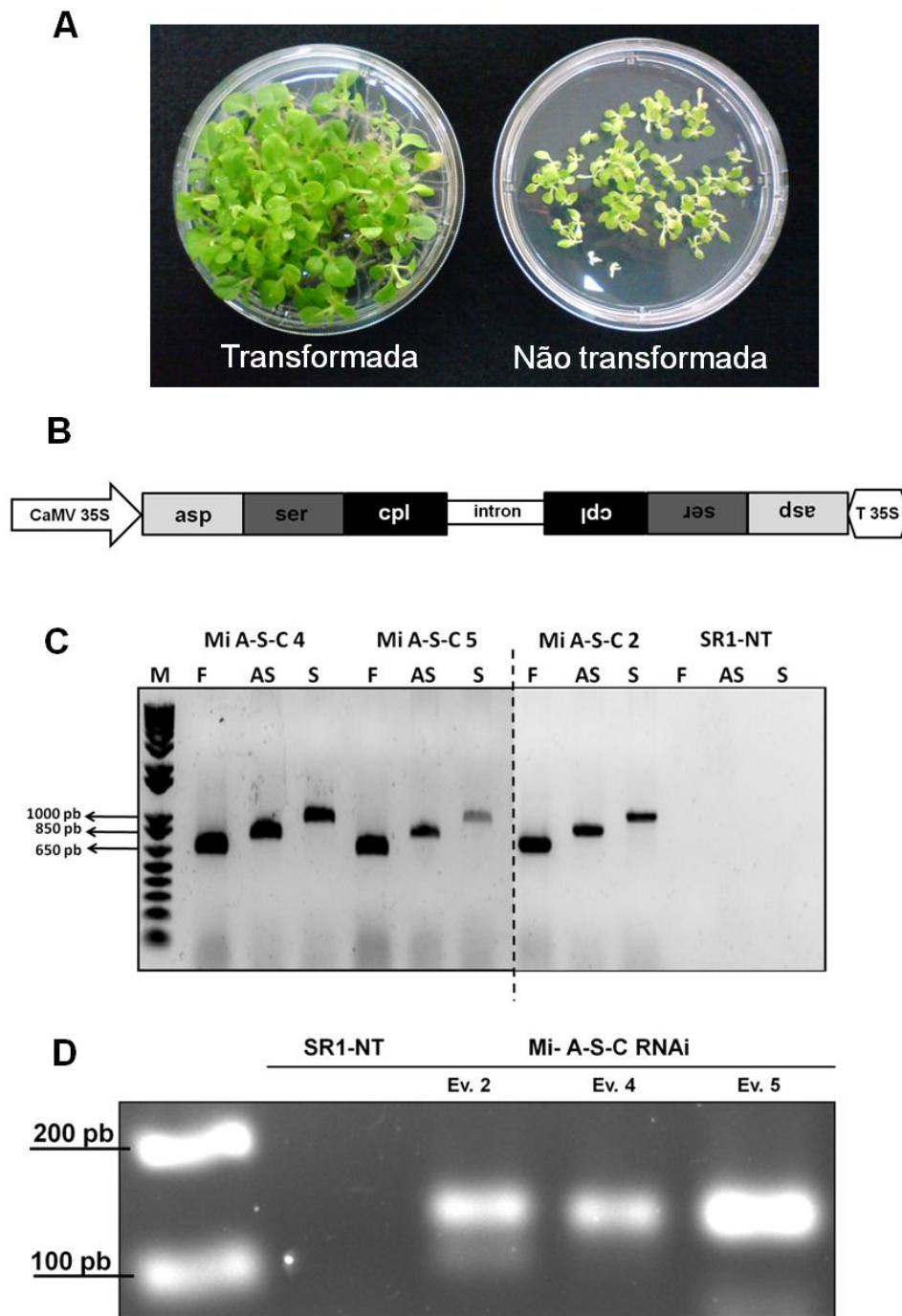
**Figura 1.3.** Regiões específicas, de cada gene, selecionadas para serem alvo de silenciamento via RNAi. As regiões escolhidas estão demarcadas e os nucleotídeos, inicial e final, do gene e da sequência escolhida estão identificados.



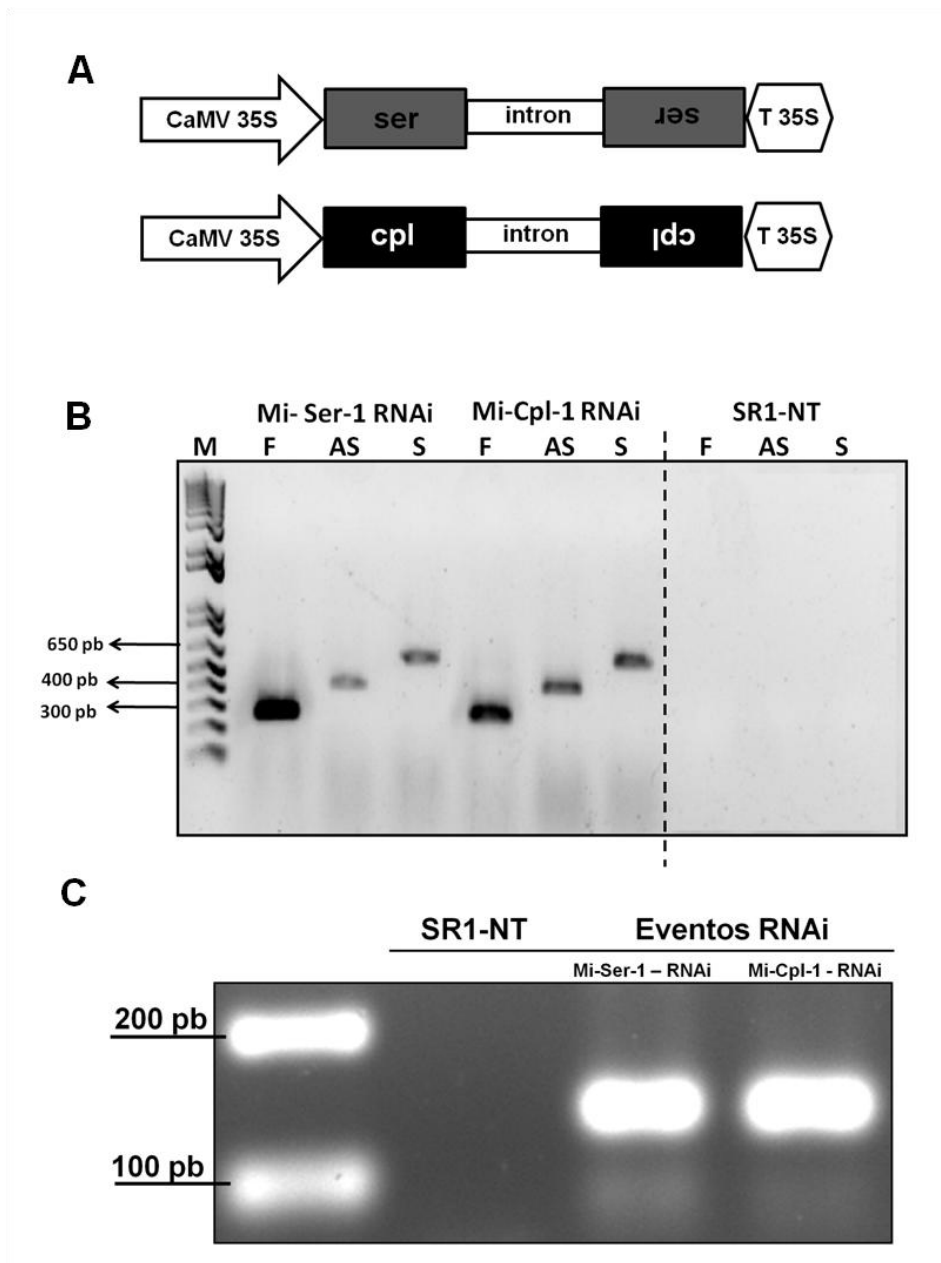
**Figura 1.4.** Amplificação e subclonagem dos fragmentos dos genes *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1*, *Mi-cpl-1* e da fusão dos três fragmentos juntos. **A**, **C**, **E** e **H**: Amplificação do fragmento de *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1*, *Mi-cpl-1* e da fusão dos três fragmentos fusionados, respectivamente; **G**: Amplificação dos três fragmentos isoladamente na fusão clonada no vetor pBluescript II; **B**, **D**, **F** e **I**: Digestão com *EcoRV* e *NheI* do vetor pDONR 221 contendo os fragmentos de *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1*, *Mi-cpl-1* e da fusão dos três fragmentos fusionados, respectivamente. M. Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); V. vetor pDONR 221 não-recombinado; C-. Controle negativo da reação contendo a reação de polimerase sem o DNA molde.



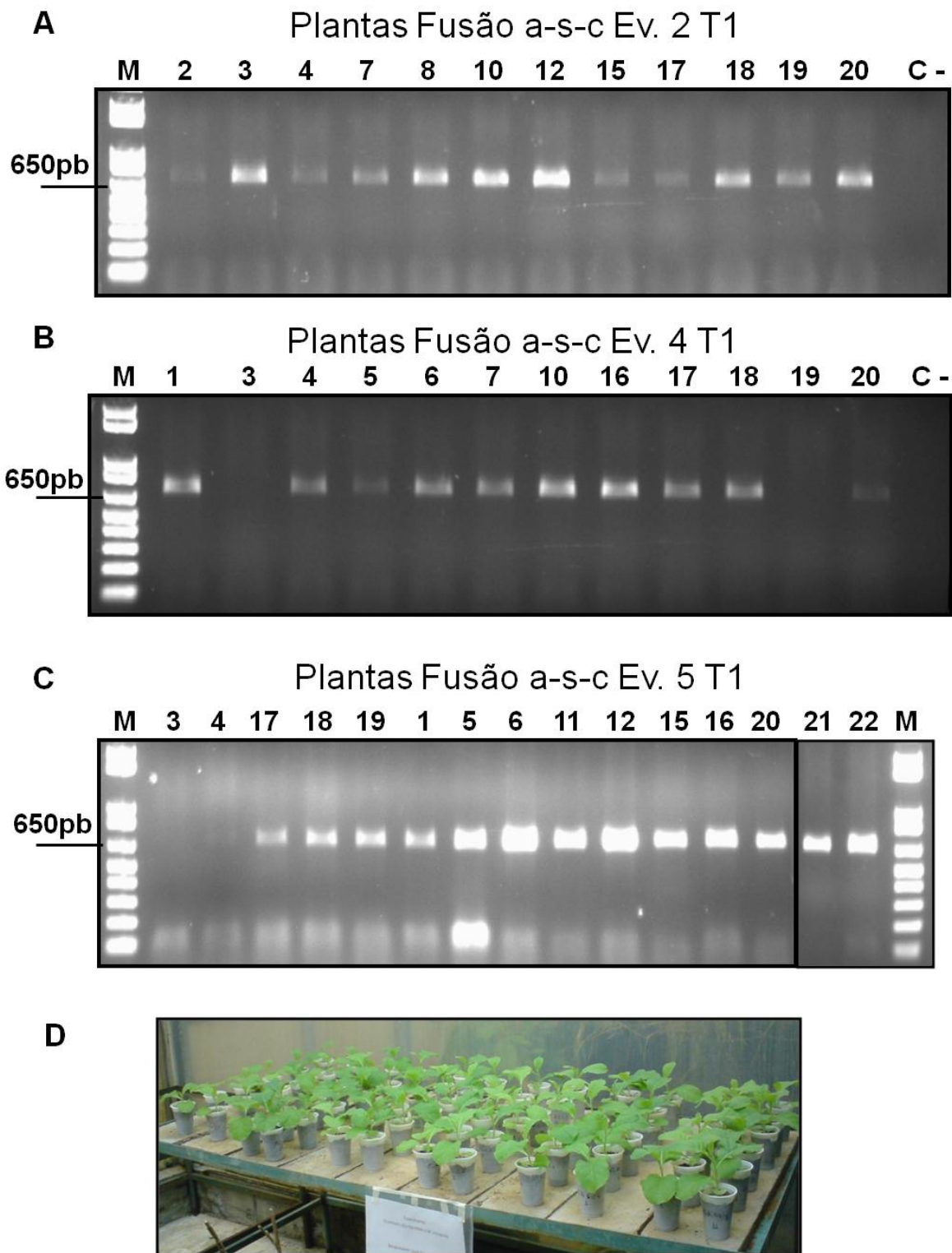
**Figura 1.5.** Subclonagem dos fragmentos dos genes *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1*, *Mi-cpl-1* e da fusão dos três fragmentos juntos no vetor pK7GWIWG2(I) e PCR de colônias de *Agrobacterium*. **A, C, E e G:** Digestão com *Hind*III e *Xba*I das construções no vetor pK7GWIWG2(I); **B, D, F e H:** Amplificação dos fragmentos de *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1*, *Mi-cpl-1* e da fusão dos três fragmentos fusionados, respectivamente, em *Agrobacterium*. M. Marcador 1 Kb plus (Invitrogen); V. Vetor pK7GWIWG2(I) não-recombinado.



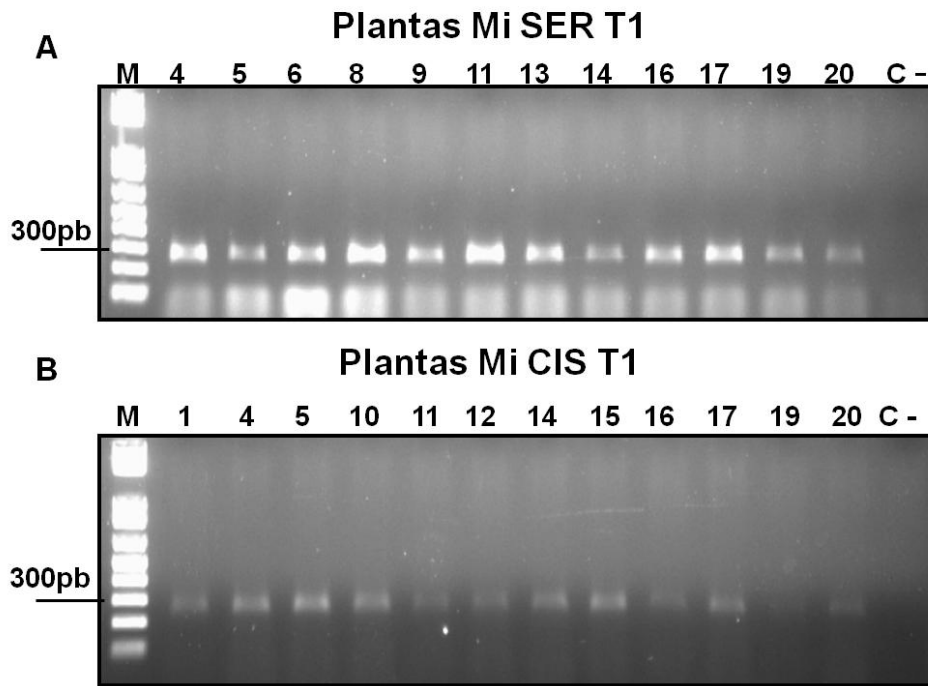
**Figura 1.6.** Caracterização das linhagens transgênicas transformadas com a construção contendo os fragmentos das proteases fusionados em sequência. **A.** Germinação de sementes obtidas a partir das plantas transformadas em meio MS contendo 100 µg/ml de canamicina. As plântulas transformadas se desenvolvem normalmente e as plantas não transformadas morrem poucos dias após a germinação; **B.** Esquema da construção das três proteases fusionadas em sequência no vetor de expressão de dsRNA pK7GWIWG2(I), dirigida pelo promotor 35S (CaMV 35S) e contendo o terminador do 35S (T 35S); **C.** Caracterização dos eventos de tabaco quanto a presença da fusão no sentido senso e anti-senso no DNA genômico (F. fusão dos fragmentos; AS, fragmento anti-senso; fragmento senso); **D.** Detecção do fragmento do intron do vetor pK7GWIWG2(I) no RNA total pré-processado, nos eventos transformados, por RT-PCR.



**Figura 1.7.** Caracterização das linhagens transgênicas transformadas com as construções para silenciamento das proteases *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1*. **A.** Esquema das construções para silenciamento das proteases *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* no vetor de expressão de dsRNA pK7GWIWG2(I), dirigida pelo promotor 35S (CaMV 35S) e contendo o terminador do 35S (T 35S); **B.** Caracterização dos eventos de tabaco quanto a presença da fusão no sentido senso e anti-senso no DNA genômico (F. fusão dos fragmentos; AS, fragmento anti-senso; S, fragmento senso); **C.** Detecção do fragmento do intron do vetor pK7GWIWG2(I) no RNA total pré-processado, nos eventos transformados, por RT-PCR.

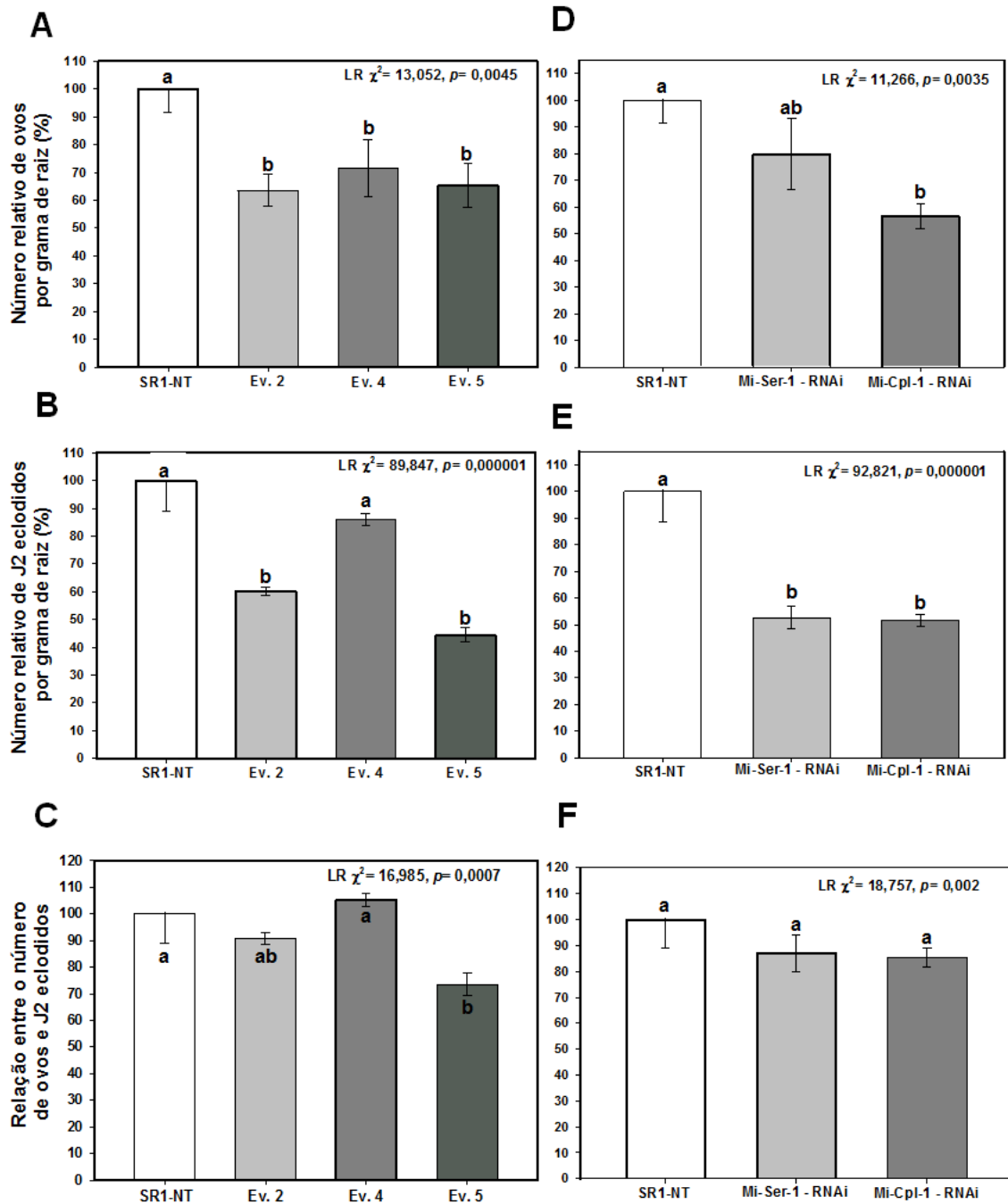


**Figura 1.8.** Exemplo de genotipagem das plantas transformadas com a construção para expressão de dsRNA para as proteases aspártica, serínica e cisteínica fusionadas. **A.** evento de transformação 2; **B.** evento de transformação 4; **C.** Evento de transformação 5. **D.** As plantas que apresentaram o fragmento correspondente de aproximadamente 700 pb foram utilizadas nos bioensaios de infecção com *M. incognita*. Para esta genotipagem foram utilizados os oligonucleotídeos Mi-ASP1\_GTWY F e Mi-CIS\_GTWY R (Tabela 2.1).

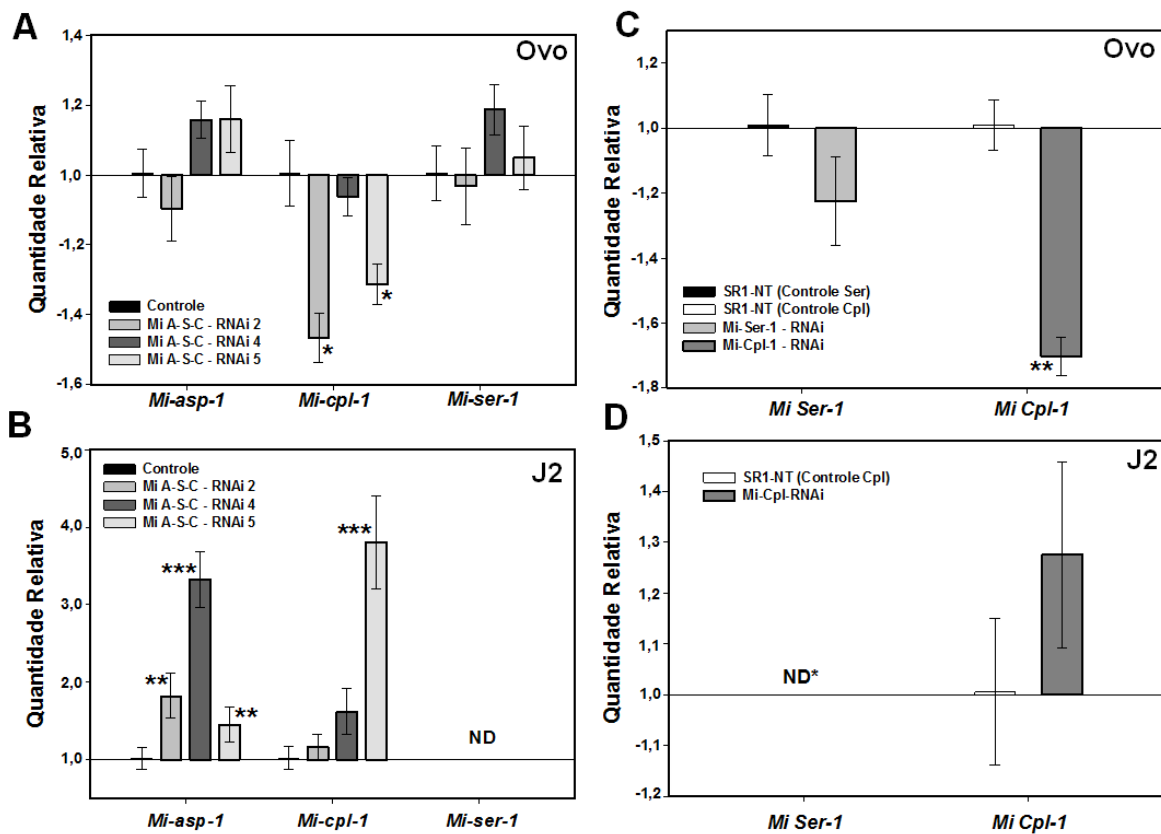


**Figura 1.9.** Exemplo de genotipagem das plantas transformadas com as construções para expressão de dsRNA para as proteases serínica e cisteínica isoladamente. **A.** evento de transformação Mi-SER; **B.** evento de transformação Mi-CPL; Para esta genotipagem foram utilizados os oligonucleotídeos Mi-SER\_GTWY F e R para *Mi-ser-1* e Mi-CIS\_GTWY F e R, para *Mi-cpl-1* (Tabela 2.1).

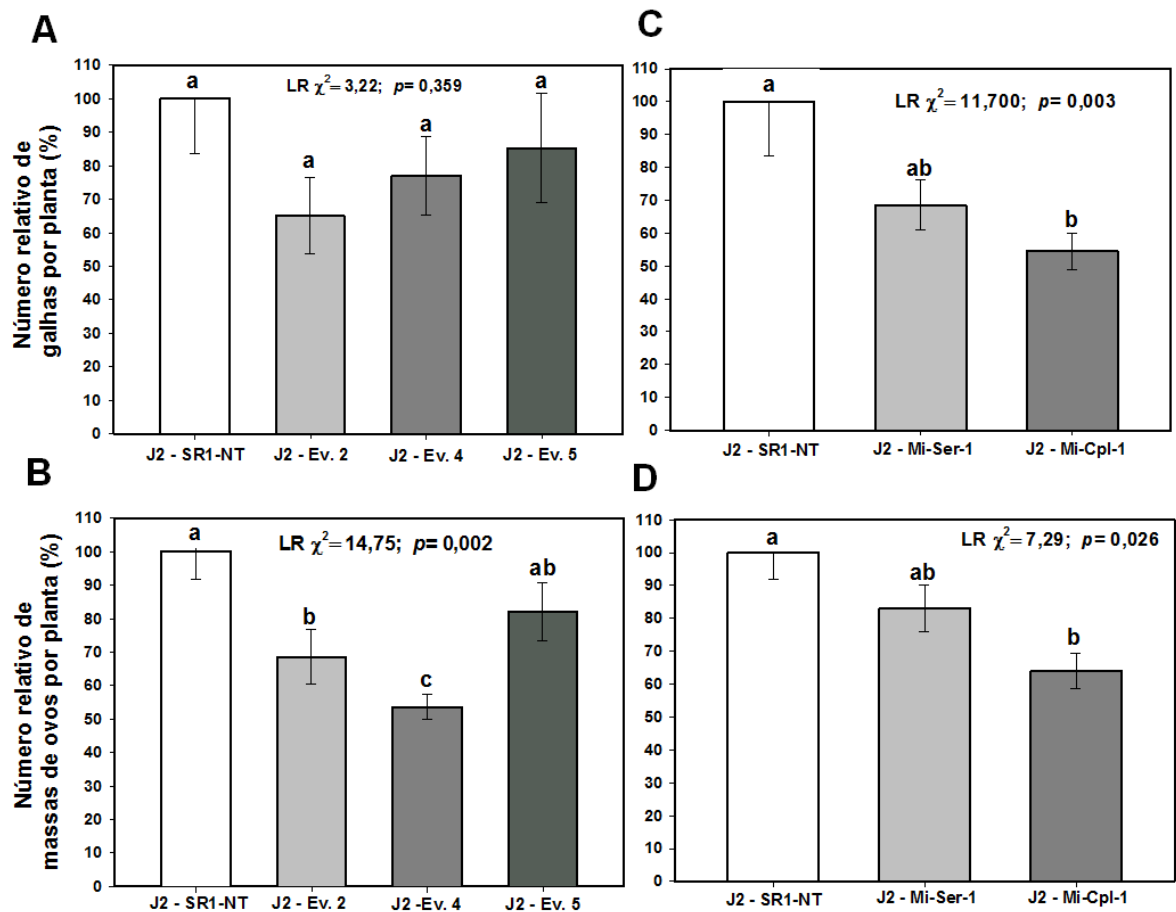




**Figura 1.10.** Efeito das plantas expressando dsRNA para as construções pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c, pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) – cpl no ciclo de vida de *M. incognita*. **A.** Número de ovos por grama de raiz de *M. incognita* coletados 45 DAI de plantas expressando dsRNA da construção pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c; **B.** Número de J2 eclodidos por grama de raiz 45 dias após a coleta dos ovos oriundos dos eventos transformados com a construção pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c; **C.** Relação entre o número de J2 eclodidos e o número inicial de ovos coletados da construção pK7GWIWG2(I)- fusão a-s-c. **D.** Número de ovos por grama de raiz de *M. incognita* coletados 45 DAI de plantas expressando dsRNA das construções pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) - cpl; **E.** Número de J2 eclodidos por grama de raiz 45 dias após a coleta dos ovos oriundos dos eventos transformados com as construções pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) - cpl; **F.** Relação entre o número de J2 eclodidos e o número inicial de ovos coletados das construções pK7GWIWG2(I) – ser e pK7GWIWG2(I) - cpl. Barras com letras diferentes diferem entre si pela análise de contrastes ( $p < 0,05$ ) (Pacote “contrast”, programa R).



**Figura 1.11.** Quantificação do acúmulo de transcritos por qRT-PCR das três proteases de ovos e J2 de *M. incognita* oriundos de eventos RNAi com a construção pk7GWIWG2(I) – fusão a-s-c, e das proteases serínica para a construção pk7GWIWG2(I) – ser e cisteínica para a construção pk7GWIWG2(I) – cpl. **A.** Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* em ovos de *M. incognita* em comparação com o tratamento controle; **B.** Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes *Mi-asp-1* e *Mi-cpl-1* em J2 em comparação com o tratamento controle; **C.** Quantificação do acúmulo dos transcritos dos genes *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1* em ovos de *M. incognita* em comparação com o tratamento controle; **D.** Quantificação do acúmulo de transcritos do gene *Mi-cpl-1* em J2 em comparação com o tratamento controle; ND\* Neste experimento não foi possível detectar quantidades confiáveis de transcritos deste gene devido, provavelmente, ao baixo acúmulo de transcrito do gene *Mi-ser-1* em J2 (Figura 4.1.B). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , Análise de iterações (REST 2009).



**Figura 1.12.** Experimento de reinfecção dos Juvenis em estágio 2 (J2) oriundos de eventos transgênicos que expressavam dsRNA para as três proteases simultaneamente, e para as proteases serínica e cisteínica separadamente, em plantas não transgênicas. **A.** Avaliação do número de galhas do experimento de reinfecção com J2 oriundos das plantas transformadas com a construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c; **B.** Avaliação do número de massas de ovos do experimento de reinfecção com J2 oriundos das plantas transformadas com a construção pK7GWIWG2(I) – fusão a-s-c; **C.** Avaliação do número de galhas do experimento de reinfecção com J2 oriundos das plantas transformadas com as construções pK7GWIWG2(I) – ser e cpl; **D.** Avaliação do número de massas de ovos do experimento de reinfecção com J2 oriundos das plantas transformadas com as construções pK7GWIWG2(I) – ser e cpl. Barras com letras diferentes diferem entre si pela análise de contrastes ( $p < 0,05$ ) (Pacote “contrast”, programa R).

## **CAPÍTULO 2: Expressão ectópica de uma proteína de glândula dorsal de *Meloidogyne incognita* acelera a formação do sítio de alimentação do nematoide.**

### **Resumo**

Espécies do gênero *Meloidogyne* são parasitas de plantas presentes em todo o mundo. Estas espécies são estudadas intensamente devido aos danos provocados a uma ampla variedade de culturas de importância agrônômica. Alguns relatos na literatura indicam que as proteínas de glândula dorsal de *Meloidogyne* spp. podem desenvolver funções importantes para permitir o estabelecimento de um sítio de alimentação funcional do nematoide. A função precisa destas proteínas no processo de desenvolvimento do sítio de alimentação é desconhecida. Para adquirir conhecimento da função destas proteínas secretadas de *M. incognita*, a proteína 7E12 de glândula dorsal foi expressa constitutivamente em plantas de tabaco. O número de galhas em oito e 16 dias após a inoculação (DAI) foram significativamente maior nas plantas expressando a proteína 7E12 do que nas plantas controle. A análise histológica das galhas induzidas pelo nematoide nas plantas transgênicas revelou células gigantes com mais vacúolos e número de invaginações da parede celular aumentado, enquanto as células vizinhas em torno das células gigantes foram mais numerosas. Além disso, foi observada uma rápida formação de galhas e eclosão de J2 nos tratamentos com plantas GM. A partir destes resultados pode-se sugerir que a presença da proteína 7E12 na planta de tabaco acelerou a formação das galhas e eclosão de J2 de *M. incognita*.

**Palavras-chave:** Nematoide formador de galhas; infecção parasítica; ciclo de vida de *Meloidogyne incognita*; expressão constitutiva de proteínas.

## 2.1. Introdução

Os prejuízos provocados por fitonematoides como os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp) e dos cistos (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.), atingem uma taxa anual de cerca de US\$ 125 bilhões, mundialmente [1]. Neste contexto, a espécie *M. incognita*, é considerada a mais perigosa dos nematoides parasitas de plantas, infectando mais 1700 espécies vegetais devido ao seu hábito polífago [2].

No início do ciclo de parasitismo de *M. incognita*, os J2 eclodem dos ovos e se movem para as pontas das raízes de plantas suscetíveis guiados por estruturas cuticulares e secreções dos anfídios [3]. Fioretti e colaboradores [3] utilizaram anticorpos monoclonais contra proteínas da cutícula e dos anfídios e confirmaram que a motilidade do nematoide pode ser afetada e causar atraso na penetração da raiz como observado em nematoide dos cistos. Após localizar a ponta da raiz, os parasitas invadem a raiz utilizando o estilete tanto mecanicamente, como liberando um conjunto de hidrolases tais como glucanases, xilanases e pectinases para digerir a parede celular e os polímeros da lamela das células [4-6]. A importância destas enzimas durante a invasão da raiz foi demonstrada por Chen e colaboradores [7]. Eles mostraram que o silenciamento de uma  $\beta$ -1,4, endoglucanase do nematoide dos cistos, *Globodera rostochiensis*, usando RNA interferente (RNAi), resultou na diminuição do número de nematoides que conseguiram invadir as raízes de *Solanum tuberosum*. Apesar da função óbvia das enzimas hidrolíticas na penetração dos nematoides na raiz, nenhuma informação está disponível a respeito do mecanismo de migração do nematoide ou do estabelecimento do sítio de alimentação [8].

Alguns estudos contribuíram para a identificação de potenciais moléculas-sinal envolvidas no mecanismo de parasitismo de nematoides das galhas e dos

cistos. A primeira proteína descrita e bem caracterizada foi a corismato mutase I de *M. javanica* [9]. Esta enzima metabólica secretada pelo nematoide foi expressa ectopicamente em raízes de soja, e induziram um fenótipo de redução e abortamento de raízes laterais. Foi especulado que este fenótipo foi causado pela degradação do corismato no citoplasma reduzindo os níveis de auxina no plastídio, resultando em alterações na via do shikimato [9]. Outro regulador descrito em glândula esofágica de *H. glycines* denominado Hg-SYV4, um peptídeo secretado relacionado à família CLAVATA3/ESR. Este peptídeo, Hg-SYV4, suprime a expressão do fator de transcrição WUSCHEL, quando expresso constitutivamente em plantas transgênicas de *A. thaliana* [10]. Estas linhagens foram caracterizadas pela redução da população de células tronco, uma terminação prematura do meristema apical e o desenvolvimento de flores sem o gineceu central [10]. Além disso, a expressão em *A. thaliana* do peptídeo 16D10 secretado por *M. incognita* estimulou o crescimento das raízes, provavelmente resultado da interação deste peptídeo com fatores de transcrição do tipo SCARECROW [11]. Considerando estes resultados é razoável concluir que as proteínas secretadas pelo nematoide podem afetar as funções da célula vegetal, e sugerir função ativa destas moléculas no desenvolvimento do sítio de alimentação destes organismos.

De acordo com estudos disponíveis na literatura, especula-se que os nematoides fitopatogênicos liberam sinais no tecido do hospedeiro durante o ciclo de parasitismo, e estas moléculas são comumente chamadas efetores de parasitismo. O papel destes efetores de parasitismo na adaptação das células vegetais para permitir o desenvolvimento do nematoide foi sugerido por Zinov'eva e colaboradores [12]. A indução da formação das células gigantes multinucleadas também é mediada por efetores, entretanto o mecanismo de reprogramação da expressão gênica da planta ainda é desconhecido [13].

Devido às implicações comprovadas das glândulas esofágicas no parasitismo, as glândulas subventral e dorsal estão sendo estudadas intensamente [14, 15]. Bibliotecas de cDNA do conteúdo citoplasmático destas glândulas revelaram que a maioria dos potenciais genes de parasitismo não tem similaridade com nenhuma das proteínas conhecidas e foram então, denominados como novos genes [16].

A proteína 7E12 foi uma das escolhidas a partir de uma série de proteínas pioneiras de um biblioteca de cDNA de *M. incognita* produzida por Huang *et al.* [16], para a obtenção de dados a respeito da sua função, porque esta proteína provavelmente funciona com um efector de parasitismo, assim como a proteína 16D10, por exemplo, descrita por Huang e colaboradores [11]. Neste trabalho, são apresentados dados que ilustram que a expressão ectópica de 7E12 é capaz de estimular o desenvolvimento mais rápido do sítio de alimentação de *M. incognita* em plantas de tabaco GM, resultando também, na eclosão mais rápida dos J2 da progênie. Estes dados fornecem novas possibilidades para o desenvolvimento de plantas de importância econômica resistentes e/ou tolerantes à infecção por nematoides.

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi elucidar a função da proteína pioneira 7E12 visando uma melhor compreensão da relação que as proteínas secretadas pelas glândulas esofágicas do nematoide têm com as plantas e sua importância no parasitismo.

### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Confirmar a localização espacial do RNA mensageiro do gene *7E12* por hibridização *in situ*;
- Subclonar o cDNA correspondente do gene *7E12* fusionado a proteína GFP em vetor para transformação de plantas;
- Obter eventos transgênicos de *Nicotiana tabacum* expressando a proteína 7E12 fusionada a GFP;
- Realizar análise macro e microscópica dos fenótipos resultantes da expressão de 7E12 no ciclo de vida de nematoides submetidos às plantas GM.



## **2.3. Materiais e Métodos**

### **2.3.1. Amplificação do gene a partir de cDNA de J4/Fêmea e hibridização *in situ* do tipo “whole-mount”**

O RNA de J4/fêmeas de *M. incognita* foi extraído de acordo com Gao e colaboradores [15], em seguida, foi realizada a síntese de cDNA com o kit SuperScript™ II (Invitrogen™, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Oligonucleotídeos iniciadores necessários para a clonagem do cDNA de *7E12* foram desenhados utilizando a sequência de RNAm de *7E12* depositada no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.org](http://www.ncbi.nlm.nih.org)) com o número de acesso AF531166. O cDNA do gene *7E12* foi então subclonado no vetor pGEM-T easy (Promega, EUA).

Para avaliar a distribuição espacial do acúmulo de transcrito do gene *7E12*, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* do tipo “whole mount”. Sondas de RNA senso e anti-senso foram marcadas com digoxigenina, utilizando o DIG RNA labeling kit (SP6/T7) (Roche, EUA). As sondas foram feitas por transcrição reversa do cDNA do gene *7E12* subclonado no vetor pGEM-T easy. A marcação da sonda foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Fêmeas de *M. incognita* foram extraídas das raízes de acordo com Hussey e Baker [17], separadas por pipetagem e fixadas com solução de 2% de paraformaldeído. A hibridização *in situ* foi feita como descrito por de Boer e colaboradores [18].

### **2.3.2. Clonagem do cDNA *7E12* de *M. incognita* para expressão em plantas**

O cDNA do gene de *7E12* foi sintetizado a partir de RNA de fêmeas de *M. incognita*. O RNA foi extraído e amplificado como previamente descrito. Para a clonagem, foi utilizado o sistema Gateway (Invitrogen™) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA do gene *7E12* de *M. incognita* foi amplificado sem o peptídeo

sinal putativo, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 7E12 F (5'GGGG**GACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG**CTTAGCAGGCGATCGAAATGCATC 3') e 7E12 R (5'GGGG**ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG**TCTTAAACAGTATTA GCTCTTCC3'), contendo os sítios de recombinação do sistema Gateway (em negrito). O produto de PCR foi purificado, subclonado no vetor pDONR™ 221 (Invitrogen™) e, em seguida, subclonado no vetor binário pK7WGF2 [19] para expressão de fusões com GFP em plantas. A construção para expressão foi composta do gene *gfp* fusionado a parte N-terminal do gene *7E12* dirigido pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S). O cassete de expressão também continha o terminador 35S e o gene *nptII* como marcador de seleção (Figura 2.1). Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento.

### **2.3.3. Transformação e seleção das plantas expressando 7E12**

A construção para expressão ectópica do cDNA do gene *7E12* em plantas de tabaco foi transformada em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 por eletroporação. As células de *A. tumefaciens* transformadas foram co-cultivadas com discos foliares de *N. tabacum* (var. Xantii). O material foi subsequentemente multiplicado *in vitro* de acordo com o método descrito por Horsch e colaboradores [20]. DNA e RNA extraídos de plantas de *N. tabacum* (T1) foram usados para análises por PCR e RT-PCR com o objetivo de verificar a integração da fusão GFP:7E12 no DNA genômico e transcritos, respectivamente, nas plantas transgênicas.

#### **2.3.4. Inoculação dos nematoides e estudo de infecção**

A inoculação com *M. incognita* foi realizada em plantas de *N. tabacum* (var. Xantii) transgênicas (dois eventos independentes de transformação foram selecionados com 16 repetições cada) e plantas controle (16 repetições) cultivadas em casa de vegetação. Ovos de *M. incognita* foram extraídos de acordo com Hussey e Baker [17] a partir de cultura em raízes de tomate (*Solanum lycopersicum*). A suspensão com ovos foi submetida à técnica do funil de Baermann modificada em um recipiente com água destilada para eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) a temperatura ambiente durante 48 h. Os J2 eclodidos foram coletados por centrifugação a 700 g por 5 minutos e quantificados em câmara de Peters. Cada planta foi inoculada com 600 J2.

Com o objetivo de analisar a eficiência de eclosão de nematoides J2 no final do seu ciclo de vida, 40 massas de ovos foram coletadas 45 dias após infecção (DAI) das plantas transgênicas e não transgênicas de *N. tabacum* e transferidas para câmaras individuais de eclosão. Após 24 e 48 horas, os J2 foram contados em microscópio de luz.

#### **2.3.5. Preparo de amostras e análises de microscopia**

Raízes de plantas de *N. tabacum* GM e não GM inoculadas com *M. incognita* foram coletadas 8, 16 e 28 DAI e retiradas amostras do meristema apical e entrenós das raízes secundárias de cada planta. Segmentos das raízes foram fixados com 2% de gluteraldeído, desidratados sequencialmente em etanol a 10, 30, 50, 70, 90 e 100%, e infiltrados com resina Technovit 7100 (EMS, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Os blocos polimerizados foram cortados com o auxílio de

um micrótomo (2 - 4  $\mu\text{m}$ ) e, subsequentemente, corados com azul de toluidina para visualização em microscópio.

### **2.3.6. Extração de proteínas e imunodeteção por dot blot**

Extratos aquosos de proteínas foram preparados a partir de um grama de raízes de plantas de *N. tabacum* GM e não GM 16 dias após inoculação com J2 de *M. incognita* trituradas em um volume final de 1,5 mL de tampão de extração (fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 20 mM, DTT 2 mM, PMSF 0.1%, pH 7,0). Os extratos protéicos de raiz permaneceram sob agitação suave a 4 °C por 2 horas. As amostras foram então centrifugadas a 8000 *g* por 30 minutos. A concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford [21] e o perfil protéico foi determinado via SDS-PAGE 12% [22]. Os extratos foram precipitados em acetona como descrito por Hames e Rickwood [23] com a quantidade final variando entre 50 e 400  $\mu\text{g}$  para cada planta. As amostras foram ressuspendidas em 50  $\mu\text{L}$  de tampão PBS (1X) e transferidas para uma membrana Imobilon-P, utilizando um concentrador a vácuo (BioRad, EUA). A transferência das proteínas foi realizada durante a noite (16 horas, aproximadamente) com agitação contínua a 4 °C empregando 0.09 V/ 30 mA em um sistema de transferência à seco da Bio-Rad. A membrana foi colocada em um tubo de 50 mL e bloqueada com uma solução PBS por duas horas a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com tampão PBS (pH 7.0) contendo Tris-HCl 5 mM, NaCl 15 mM, Tween 20 (1%), e leite (1%) e incubada durante a noite com uma diluição de 1:5000 de um anticorpo anti-GFP conjugado a Alexa Fluo 594 (Alexa - Invitrogen) sob condição de agitação a 4 °C. Finalmente, a membrana foi lavada três vezes com tampão PBS (pH 7.5) contendo 5

mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl e Tween 20 (1%) e analisada com microscópio fluorescente (Zeiss AxioImager).

### **2.3.7. Análise estatística**

Para comparar e avaliar o número de galhas, massas de ovos, eficiência de eclosão de J2 e peso seco de raiz de plantas GM e não GM, foi utilizada a análise de variância ANOVA e teste de Tukey para comparação de medias, utilizando o software SPSS (SPSS Inc., EUA).

## **2.4. Resultados**

### **2.4.1. Localização espacial do RNA mensageiro do gene 7E12 por hibridização *in situ***

Para localizar o acúmulo de transcritos de 7E12 em fêmeas de *M. incognita*, foi realizada hibridização *in situ* utilizando o próprio 7E12 como sonda. Na figura 2.2 observa-se um corte de fêmea adulta do nematóide. O estilete (S), esôfago (E), metacarpo (M) e glândula dorsal esofagica (DG) estão identificados. A hibridização *in situ* da sonda 7E12 mostra um sinal forte e específico na glândula dorsal, confirmando resultado similar obtido por Huang e colaboradores [16] que relata que a proteína 7E12 é especificamente transcrita nas glândulas esofágicas subventrais e dorsal em J2 parasitas e estádios posteriores de *M. incognita*.

### **2.4.2. Análise de DNA e proteína de plantas GM confirmam a presença do gene e da proteína de fusão GFP:7E12**

Plantas T1 resistentes que germinaram na presença de canamicina foram selecionadas para serem caracterizadas por PCR. Duas reações foram realizadas: uma para detecção da região codante do gene 7E12 e outra para confirmar a fusão do gene de *gfp* com 7E12. Dois eventos apresentaram os fragmentos com tamanho esperado (Figura 2.3), sendo então selecionados para experimentos posteriores. As plantas PCR positivas foram, então, selecionadas para verificação de expressão da construção GFP:7E12, por “dot blot”. Em um primeiro ensaio, alíquotas de 50 µg de proteína extraída de raízes de plantas GM e não GM foram sondadas com o anticorpo anti-GFP. Na figura 2.4 observa-se que, sob estas condições, apenas o

controle positivo demonstrou uma imunoreação positiva. No entanto, em um novo ensaio utilizando extrato de proteínas de raízes concentrado oito vezes (400 µg), a presença de um sinal fraco de GFP pode também ser observado no evento com 7E12, o que indica uma baixa quantidade de proteína. Nos controles negativos não houve detecção, enquanto que nos controles com GFP a imunoreação positiva foi clara (Figura 2.4).

Com base nestes resultados, determinou-se que, embora presente em células de raízes, a concentração celular da proteína de fusão é muito baixa para uma captura de imagem adequada da sua fluorescência em raízes vivas.

### **2.4.3. Análises macroscópicas e microscópicas do fenótipo das raízes transgênicas**

Para avaliação de fenótipo, foram utilizados dois eventos de transformação independentes de *N. tabacum*, 7E12-1 e 7E12-2, que foram produzidos por transformação com *Agrobacterium*. Estes eventos foram selecionados pela resistência à canamicina devido à presença do gene marcador *nptII* no vetor pK7WGF2. As sementes destes dois eventos (T0) foram também selecionadas na presença de canamicina, visto que na geração T1 ocorre segregação. As sementes que foram capazes de germinar e desenvolver raízes na presença de canamicina, foram selecionadas e submetidas a análises por PCR (Figura 2.3) e RT-PCR para confirmar a presença do gene e do transcrito de 7E12 e da fusão GFP:7E12, respectivamente. Plantas não transformada foram utilizadas como controle do experimento. Foram realizadas 16 repetições por tratamento, incluindo os dois eventos 7E12 (todos confirmados para a presença da fusão GFP:7E12) e plantas controle.

As análises macroscópicas foram feitas 25 dias após a germinação. As plantas não apresentam nenhuma diferença fenotípica aparente em relação às plantas não transformadas quando não infectada por nematóides (dados não mostrados). No entanto, a comparação entre raízes oriundas de plantas GM e não GM de *N. tabacum* infectadas com J2 de *M. incognita* e coletadas 8, 16 e 28 DAI, claramente ilustraram uma diferença na morfologia e no tamanho das galhas (Figura 2.5). Nas amostras analisadas oito DAI, os eventos 7E12-1 e 7E12-2 possuíam galhas maiores e mais alongadas quando comparadas com as raízes das plantas controle (Figura 2.5). Nas plantas analisadas 16 DAI, as galhas dos eventos 7E12-1 e 7E12-2 foram maiores que as das plantas controle. Foi observada uma diferença na morfologia da galha entre os eventos GM e não GM nos estágios analisados. Estes resultados sugerem que as galhas se desenvolveram mais rápido em plantas GM que nas plantas controle.

Análises estatísticas demonstraram que o número de galhas das plantas controle e dos eventos GM, tanto os analisados 8, como 16 DAI, foi significativamente diferente (Figura 2.6). A média do número de galhas observadas para cada planta a 8 e 16 DAI foi quase duas vezes maior nas plantas GM que nas plantas controle. No entanto, 28 DAI, o número de galhas foi similar (Figura 2.6). Ambos os eventos 7E12 mostraram um maior número de galhas maiores e com morfologia modificada. Esta observação sugere que o processo de formação de galhas foi acelerado nos eventos 7E12, o que está de acordo com os dados morfológicos descritos a seguir.

Análises de microscopia de secção dos tecidos radiculares na região das galhas mostraram que as células gigantes dos eventos 7E12 são moderadamente diferentes em tamanho e morfologia quando comparadas com as plantas controle a



8 DAI. Galhas de ambos os eventos 7E12 contém células gigantes com paredes mais onduladas e um maior número de vacúolos, sendo eles menores que em plantas controle (Figura 2.7). Além disso, foi observado que as células vizinhas em torno das células de alimentação são consideravelmente mais numerosas em eventos GM (Figura 2.7).

Testes de resistência conduzidos em amostras 45 DAI resultaram em um número de massas de ovos estatisticamente semelhante entre os eventos GM e controle (dados não mostrados) produzindo uma média de 500 massas de ovos por planta. Adicionalmente, o peso seco das raízes dos eventos 7E12 foi em torno de 120 mg, similar ao peso das plantas controle (dados não mostrados). Apesar de uma formação de galhas acelerada em plantas 7E12, ao final de 45 DAI o número de galhas e de massas de ovos não foram diferentes entre os tratamentos.

A análise de eclosão dos ovos, feita com ovos coletados 45 DAI de plantas 7E12 e controle, resultou em um maior número de J2 eclodidos dos ovos advindos das plantas GM após 24 e 48 horas (Figura 2.8). O número de J2 eclodidos do evento 7E12-2 foi maior que do evento 7E12-1 (Figura 2.8). Isto sugere que a maturação dos ovos em plantas transformadas com o gene 7E12 45 DAI é mais rápida em comparação com plantas controle. Este fato é mais um indicativo de um desenvolvimento mais acelerado do nematoide nas plantas 7E12.

## 2.5. Discussão

Este estudo avaliou o papel do gene *7E12* no processo de parasitismo de *M. incognita*. Para isto, foi gerada uma construção contendo a fusão do cDNA do *7E12* com GFP para superexpressão ectópica em plantas de tabaco. A proteína *7E12* foi primeiramente isolada e descrita por Huang e colaboradores [16] usando uma biblioteca de cDNA de glândulas esofágicas de *M. incognita*. Identificar e caracterizar genes diferencialmente expressos em nematoides fitopatogênicos é uma importante estratégia para estudar processos biológicos vitais envolvendo o ciclo de vida do nematoide, como a alimentação, desenvolvimento, sinalização, reprodução e longevidade [24, 25], para uma melhor compreensão das interações parasita-hospedeiro [26].

Neste trabalho, foi utilizada uma construção em fusão com o gene repórter GFP para localizar a proteína *7E12* nas raízes de tabaco. A baixa expressão da proteína de fusão, no entanto, impediu a detecção da fluorescência de GFP na fusão protéica GFP:*7E12* nos eventos GM usando microscopia confocal.

Análises de “dot blot”, por outro lado, confirmaram a presença da proteína GFP nos extratos dos eventos transgênicos de *7E12*. Apesar da baixa concentração de GFP e, provavelmente, *7E12* nas raízes, a presença de *7E12* teve influência considerável no desenvolvimento de células gigantes. Como controle, foram utilizadas plantas não transformadas. É bem descrito na literatura que a expressão do promotor CaMV35S ou da proteína GFP não interferem no ciclo de vida de *M. incognita* [27]. Foi observado que a formação de galhas foi induzida mais cedo em plantas GM que em plantas controle. Além disso, eventos GM expressando *7E12* sempre mostraram um aumento no número de galhas, principalmente, entre 8 e 16 DAI. Células gigantes dos eventos GM continham vacúolos menores, porém mais

numerosos, e eram cercadas por um maior número de células vizinhas. Estas células gigantes dos eventos GM foram também caracterizadas por paredes celulares mais onduladas. Estes dados histológicos sugerem uma maturação mais rápida das células de alimentação em plantas que expressam ectopicamente a proteína 7E12. Finalmente, em análises feitas 28 DAI, não se observou diferença significativa no número de galhas quando comparado com plantas controle. Estes dados sugerem que a proteína 7E12 de glândula dorsal de *M. incognita* tem um importante papel no estabelecimento de uma interação compatível entre a planta e o nematoide em estágios iniciais da infecção. A proteína 7E12 provavelmente atua inicialmente durante o processo de infecção estimulando a formação de células gigantes, o que leva a um desenvolvimento mais acelerado do sítio de alimentação. Esta hipótese é apoiada pela observação de um maior número de J2 eclodidos nos eventos GM aos 24 e 48 DAI, indicando uma eclosão mais rápida quando comparado com plantas controle.

Este é o primeiro registro descrevendo uma proteína de glândula dorsal de *M. incognita* que, expressa ectopicamente em plantas, é capaz de acelerar o desenvolvimento do sítio de alimentação.

Trabalhos semelhantes em *Heterodera schachtii* relataram resultados um pouco diferentes quanto a suscetibilidade das plantas expressando constitutivamente proteínas secretadas pelo nematoide. Foi verificado que uma proteína que se liga a celulose (CBP) [28], uma proteína secretada pelo nematoide similar a uma anexina [29], e a proteína denominada Hs10A06, quando expressas em *A. thaliana*, aumentaram a susceptibilidade das plantas à infecção por nematoides. Isto também foi verificado neste trabalho nos dados coletados 8 e 16 dias de inoculo. Porém ao final de 28 dias esta diferença não era mais observada.

A proteína 7E12, secretada pelo nematoide, responsável pelo fenótipo descrito neste trabalho, ao contrário dos exemplos citados anteriormente, não possui similaridade com qualquer outra proteína de função conhecida presente no banco de dados, (BLASTn, BLASTp e BLAST X, em [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) [30]. Desta forma, a provável função desta proteína permanece desconhecida. No entanto, é conhecido que o gene *7E12* é exclusivamente transcrito na glândula dorsal de *M. incognita* [16], em algum momento entre a penetração na raiz hospedeira e a indução do sítio de alimentação, o que corresponde com o acúmulo de grânulos protéicos na glândula dorsal em desenvolvimento do parasita. Este fato fornece evidências de que a glândula dorsal de fitonematoides endoparasitas sedentários é provavelmente o principal local responsável pela síntese de fatores essenciais ao parasitismo relacionados ao controle da célula hospedeira [8].

Outra descoberta que suporta esta hipótese foi descrita por Huang e colaboradores [11], onde foi mostrado que um pequeno peptídeo chamado de 16D10, expresso na glândula dorsal de *M. incognita*, quando expresso ectopicamente em *A. thaliana*, resultou em um aumento na taxa de divisão celular em meristemas radiculares. O peptídeo 16D10 maduro foi similar ao motivo C-terminal conservado da família de proteínas de plantas CLE [31, 32]. Além disso, sugere-se que dois fatores de transcrição tipo SCARECROW da família de proteínas GRAS são alvos prováveis desta proteína do nematoide.

Com base em todos os resultados apresentados, sugere-se que a proteína 7E12 tem uma interação similar com algumas proteínas da planta envolvidas no processo de divisão celular. No entanto, a falta de informações sobre 7E12, que não apresenta similaridade com qualquer proteína de função conhecida, ou qualquer motivo ou domínio identificado em sua sequência de aminoácidos, impede a proposição de uma função específica desse polipeptídeo.

Para validar estes resultados e aumentar o conhecimento acerca da proteína 7E12 o silenciamento deste gene, utilizando a estratégia de RNAi, necessita ser realizado. Em adição a isto, é importante a identificação do(s) alvo(s) de 7E12 em plantas. A compreensão do mecanismo de proteínas de parasitismo de nematoides servirá de base para o desenvolvimento de melhores estratégias para o controle de destes nematoides fitoparasitas.

## 2.6. Conclusões

- O transcrito do gene *7E12* foi localizado em J4/fêmea por hibridização *in situ* na glândula dorsal de *M. incognita*;
- A expressão de *7E12* em plantas resultou no desenvolvimento mais acelerado do sítio de alimentação (galhas) de *M. incognita*;
- Houve um número maior de galhas a 8 e 16 DAI nas plantas GM comparadas com as plantas controle;
- Os cortes histológicos das galhas a 8 DAI, nas células gigantes das plantas GM tinham aspectos de estágios tardios, como número maior de vacúolos e células vizinhas em comparação com as células das raízes das plantas controle;
- A eclosão de J2 foi maior nos ovos oriundos das plantas GM em comparação com os coletados nas plantas controle, tanto 24, como 48h após a coleta;

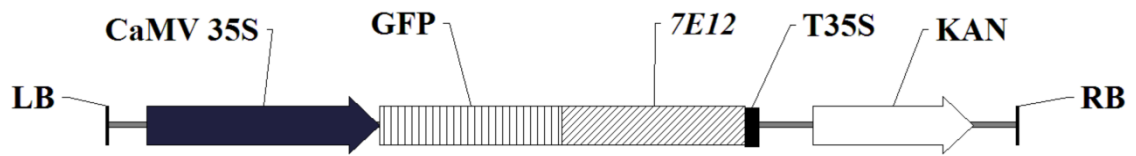
## 2.7. Referências

- [1] D.J. Chitwood, Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, *Pest Manag Sci*, 59 (2003) 748-753.
- [2] C.J. Lilley, P. Devlin, P.E. Urwin, H.J. Atkinson, Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants, *Parasitol Today*, 15 (1999) 414-417.
- [3] L. Fioretti, A. Porter, P.J. Haydock, R. Curtis, Monoclonal antibodies reactive with secreted-excreted products from the amphids and the cuticle surface of *Globodera pallida* affect nematode movement and delay invasion of potato roots, *Int J Parasitol*, 32 (2002) 1709-1718.
- [4] S. Jaubert, J.B. Laffaire, P. Abad, M.N. Rosso, A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *FEBS Lett*, 522 (2002) 109-112.
- [5] T.N. Ledger, S. Jaubert, N. Bosselut, P. Abad, M.N. Rosso, Characterization of a new beta-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases, *Gene*, 382 (2006) 121-128.
- [6] M. Mitreva-Dautova, E. Roze, H. Overmars, L. de Graaff, A. Schots, J. Helder, A. Goverse, J. Bakker, G. Smant, A symbiont-independent endo-1,4-beta-xylanase from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (2006) 521-529.
- [7] Q. Chen, S. Rehman, G. Smant, J.T. Jones, Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi, *Mol Plant Microbe Interact*, 18 (2005) 621-625.
- [8] T.J. Baum, R.S. Hussey, E.L. Davis, Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism, *Genet Eng (N Y)*, 28 (2007) 17-43.
- [9] E.A. Doyle, K.N. Lambert, *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development, *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (2003) 123-131.
- [10] X. Wang, M.G. Mitchum, B. Gao, C. Li, A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to *CLAVATA3/ESR (CLE)* of *Arabidopsis thaliana*, *Mol Plant Pathol*, 6 (2005) 187-191.
- [11] G. Huang, R. Dong, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor, *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (2006) 463-470.
- [12] S.V. Zinov'eva, N.I. Vasiukova, O.L. Ozeretskovskaia, [Biochemical aspects of plant interactions with parasite nematodes. (A review)], *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 40 (2004) 133-142.
- [13] G. Gheysen, C. Fenoll, Gene expression in nematode feeding sites, *Annu Rev Phytopathol*, 40 (2002) 191-219.

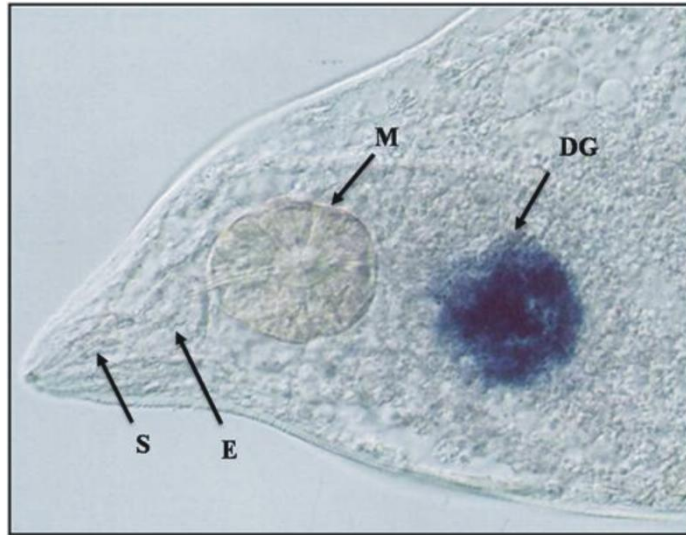
- [14] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*, *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (2003) 720-726.
- [15] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*., *Mol Plant Microb Interact*, 14 (2001) 1247-1254
- [16] G. Huang, B. Gao, T. Maier, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (2003) 376-381.
- [17] R.S. Hussey, A.A. Barker, Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. , *Plant Disease Reporter*, 57 (1973) 1025-1028.
- [18] J.M. de Boer, Y. Yan, G. Smant, E.L. Davis, T.J. Baum, In-situ Hybridization to Messenger RNA in *Heterodera glycines*, *Journal of Nematology*, 30 (1998) 309-312.
- [19] M. Karimi, D. Inze, A. Depicker, GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation *Trends Plant Sci*, 7 (2002) 193-195.
- [20] R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffman, M. Wallroth, D.Z. Eichholtz, S.G. Rogers, R.T. Fraley, A simple and general method for transferring genes into plants., *Science*, 227 (1985) 1229-1231.
- [21] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- [22] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [23] B.D. Hames, D. Rickwood, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* IRL Press, Oxford, UK, 1981.
- [24] I. Antoshechkin, P.W. Sternberg, The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research, *Nat Rev Genet*, 8 (2007) 518-532.
- [25] A. Mukhopadhyay, H.A. Tissenbaum, Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*, *Trends Cell Biol*, 17 (2007) 65-71.
- [26] G. Gheysen, B. Vanholme, RNAi from plants to nematodes, *Trends Biotechnol*, 25 (2007) 89-92.
- [27] P.E. Urwin, S.G. Moller, C.J. Lilley, M.J. McPherson, H.J. Atkinson, Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana*, *Mol Plant Microbe Interact*, 10 (1997) 394-400.



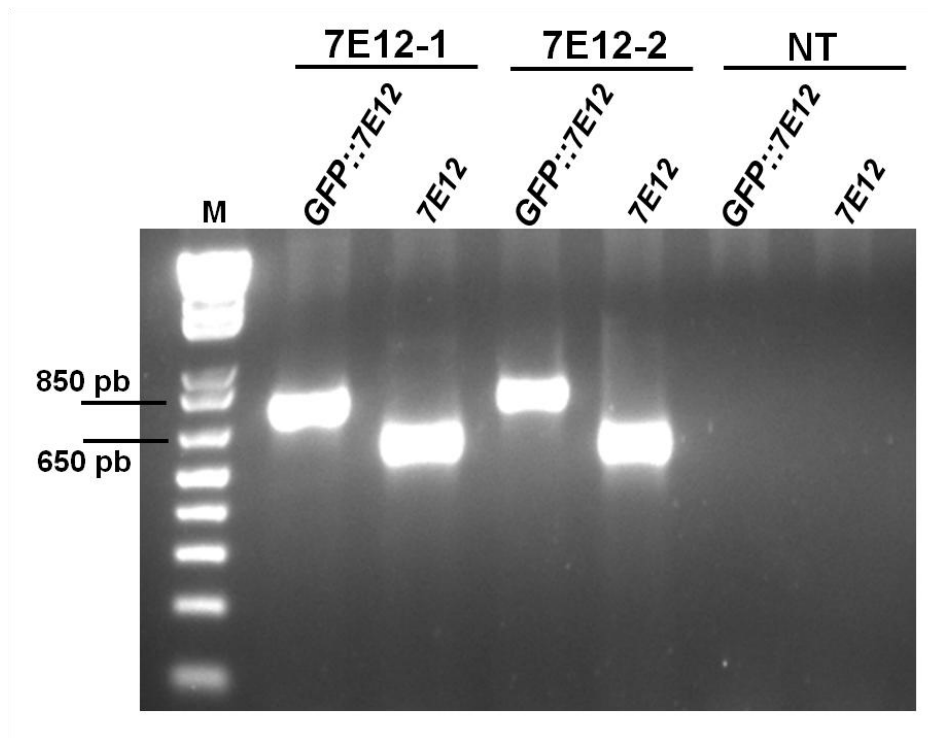
- [28] T. Hwezi, P. Howe, T.R. Maier, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, E.L. Davis, T.J. Baum, Cellulose binding protein from the parasitic nematode *Heterodera schachtii* interacts with *Arabidopsis* pectin methylesterase: cooperative cell wall modification during parasitism, *Plant Cell*, 20 (2008) 3080-3093.
- [29] N. Patel, N. Hamamouch, C. Li, T. Hwezi, R.S. Hussey, T.J. Baum, M.G. Mitchum, E.L. Davis, A nematode effector protein similar to annexins in host plants, *J Exp Bot*, 61 (2010) 235-248.
- [30] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J Mol Biol*, 215 (1990) 403-410.
- [31] J.M. Cock, S. McCormick, A large family of genes that share homology with CLAVATA3, *Plant Physiol*, 126 (2001) 939-942.
- [32] A.N. Olsen, K. Skriver, Ligand mimicry? Plant-parasitic nematode polypeptide with similarity to CLAVATA3, *Trends Plant Sci*, 8 (2003) 55-57.



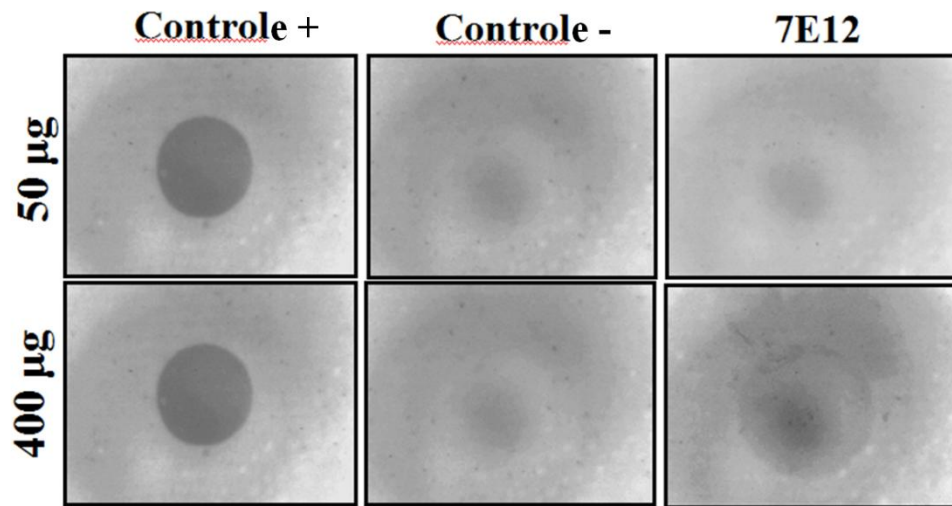
**Figura 2.1:** Cassete de expressão mostrando o promotor CaMV 35S seguido pelo gene da Proteína Fluorescente Verde (GFP) fusionado a 7E12 de glândula esofágica de *Meloidogyne incognita*. O gene de resistência a canamicina (Kan) foi utilizado como marcador de seleção. LB = borda esquerda; RB = borda direita; T35S = terminador.



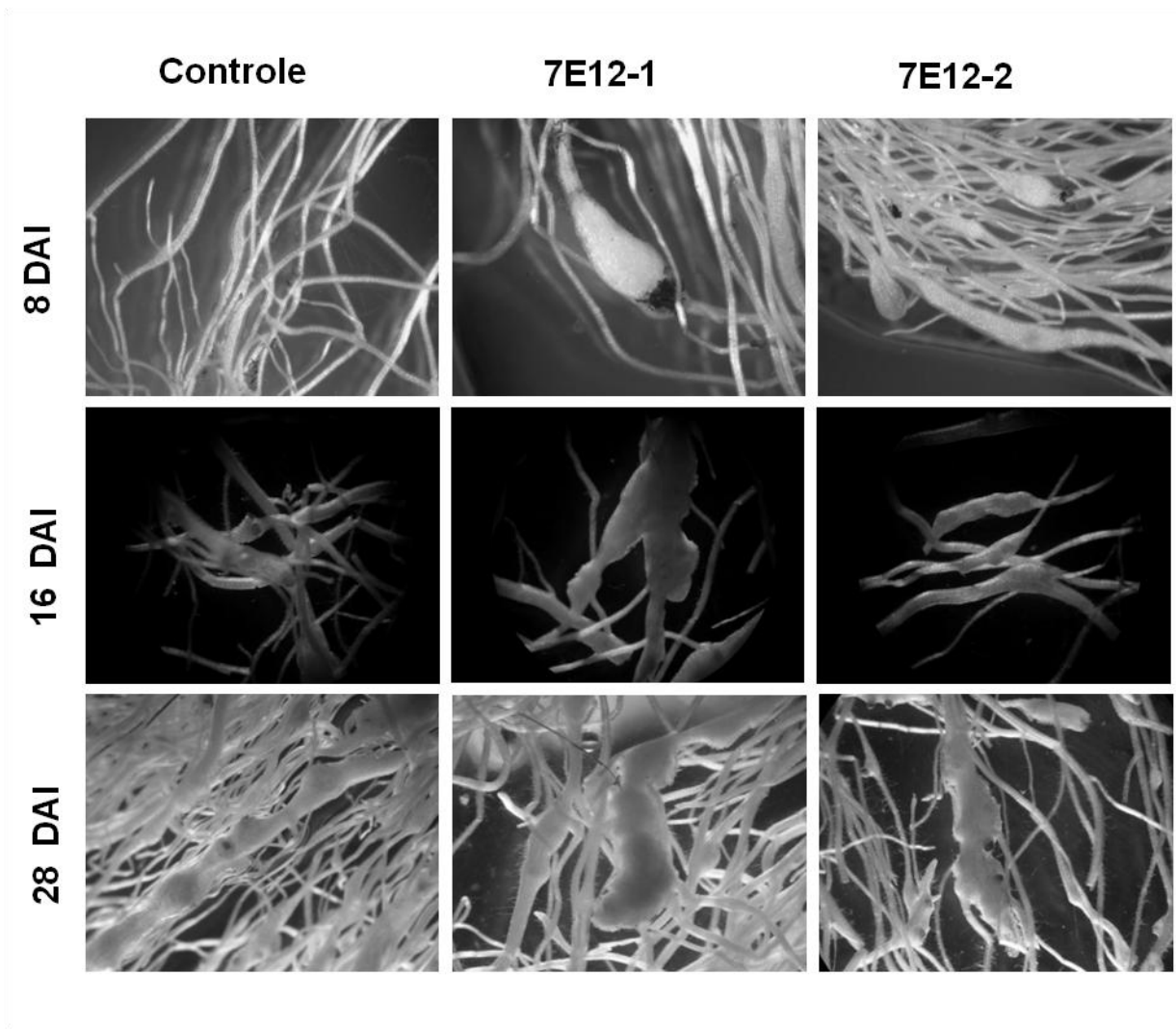
**Figura 2.2:** Localização *in situ* do RNAm de 7E12 em células da glândula esofágica dorsal de fêmeas adultas de *Meloidogyne incognita*. DG = glândula esofágica dorsal, S = estilete, E = esôfago, M = metacorpo.



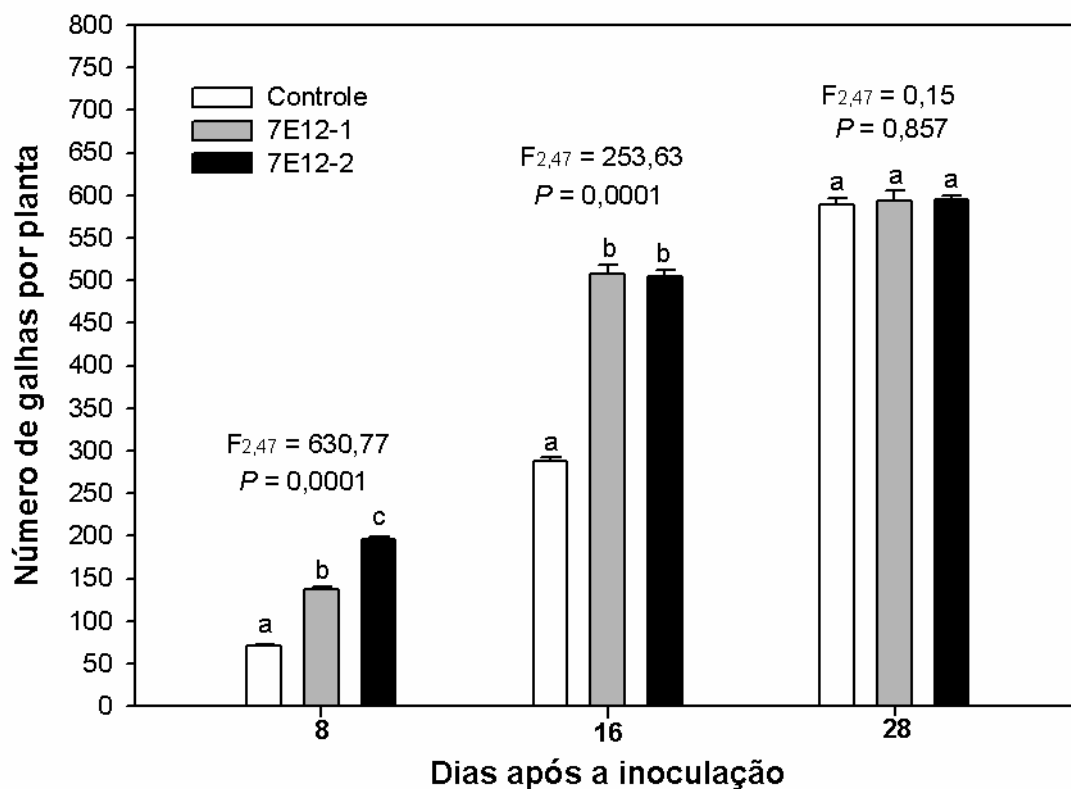
**Figura 2.3:** Detecção dos fragmentos do gene *7E12* e da fusão *gfp:7E12*, por PCR, nos eventos transformados. M. Marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder plus (Invitrogen)



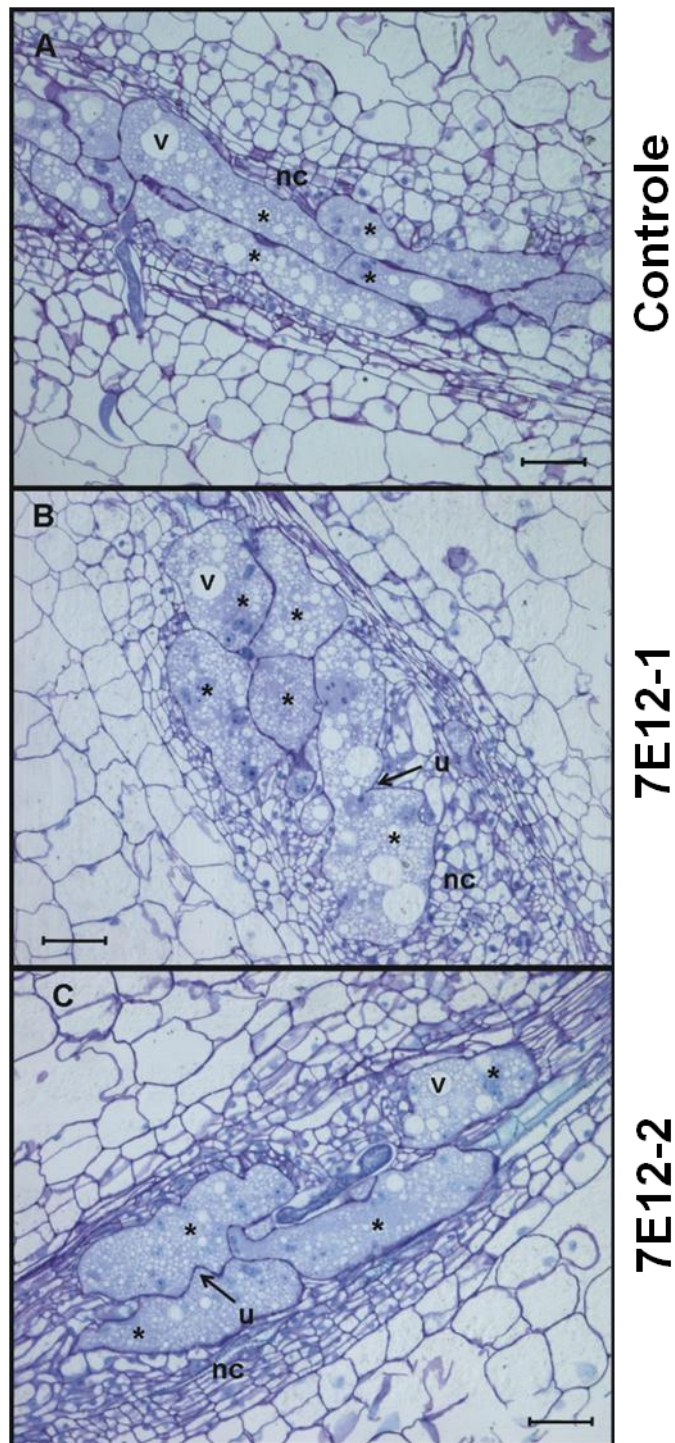
**Figura 2.4.** “Dot blot” usando o anticorpo marcador fluorescente anti-GFP. Controles positivos representam 50 e 400 µg de *Nicotiana tabacum* expressando GFP livre. Os controles negativos representam 50 e 400 µg de extratos protéicos de galhas de raízes não transgênicas *N. tabacum*. Dot blots de extratos de plantas 7E12 foram feitos com 50 e 400 µg de proteínas obtidas de plantas 15 DAI.



**Figura 2.5:** Raízes de *Nicotiana tabacum* inoculadas com segundo estágio juvenil (J2) de *Meloidogyne incognita*. As raízes foram coletadas oito, 16 e 28 DAI. No controle, plantas de *N. tabacum* foram transformadas com o cassete contendo apenas o promotor 35S, GFP e o gene de resistência a canamicina.

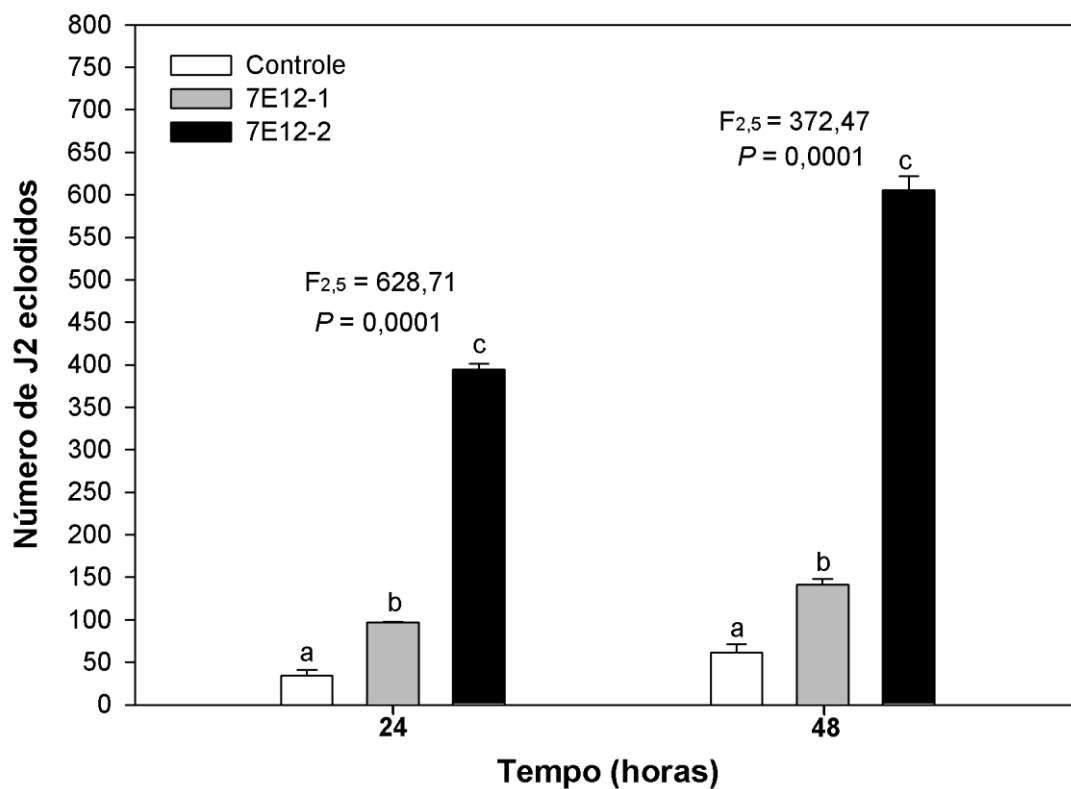


**Figura 2.6:** Número de galhas a oito, 16 e 28 DAI. O número de galhas foi contado e comparado com plantas controle. Foram utilizadas 16 plantas como replicatas para a contagem. Barras indicam o erro padrão de cada grupo e diferentes letras significam diferença estatística entre os grupos pelo teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.7:** Imagens de campo claro de células gigantes após coloração com azul de toluidina de galhas de raízes de plantas de *Nicotiana tabacum* controle e transformadas com 7E12, oito DAI com *Meloidogyne incognita*. A) Planta controle; B e C) Plantas 7E12-1 e 2 . nc = células vizinhas; v = vacúolos; u = ondulações; \* = célula gigante; barra = 100  $\mu$ m.





**Figura 2.8:** Avaliação da eclosão de J2 de plantas de *Nicotiana tabacum* controle e transformadas, 45 DAI. O número de J2 eclodidos foi determinado 24 e 48h após a remoção da massa de ovos. Barras indicam erro padrão de cada grupo e diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos pelo teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## VI - CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho teve por objetivo estudar as funções de dois grupos de moléculas que estão diretamente relacionadas com o parasitismo de *M. incognita*. Foi verificado que a interferência na expressão de enzimas proteolíticas provocou redução no sucesso parasítico de *M. incognita*, diminuindo o número de ovos e o número de J2 eclodidos. Também foi verificado que a virulência dos nematoides recuperados das plantas GM foi diminuída quando estes infectaram plantas não GM. Estes dados reforçam a importância que as proteases têm no parasitismo de *M. incognita*, tornando estas proteases um importante alvo para o controle destes parasitas. Além disso, este trabalho trouxe indícios a respeito das funções destas proteases, que podem estar envolvidas em processos presentes em estágios iniciais de parasitismo, e até mesmo em processos de embriogênese e muda. Outro dado relevante é que este é o primeiro relato a respeito de tentativa de silenciamento gênico simultâneo *in planta* em fitonematoides por intermédio de dsRNA complementares para vários genes fusionados e expressos a partir de uma mesma construção.

Outro dado importante foi comprovação que a proteína 7E12 está envolvida no processo de infecção inicial do nematoide, já que a expressão desta proteína em plantas de tabaco, fez com que o nematoide fosse capaz de desenvolver mais rapidamente o seu sítio de alimentação. De alguma forma ainda não elucidada esta proteína está envolvida no processo de formação da célula gigante. Estudos futuros poderão solucionar esta questão. Entretanto, é relatado na literatura que algumas dessas moléculas que são secretadas por fitonematoides durante o parasitismo funcionariam (i) como recrutadores de fatores da planta que estão envolvidos em

processos de divisão celular, e em outros casos, (ii) estas moléculas imitam funcionalmente estes fatores.

Os dados gerados e discutidos neste trabalho confirmaram a importância das moléculas efectoras de parasitismo como ponto de partida para se conseguir plantas que sejam tolerantes ou resistentes à fitonematoides. É importante salientar que em contrapartida se faz necessário estudar também, as moléculas de defesa das plantas, entender o mecanismo de resistência que alguns acessos de diferentes espécies possuem para verificar como estas plantas conseguem tolerar e/ou impedir o parasitismo de nematoides endoparasitas sedentários.

Tendo em mãos estas informações, será possível desenvolver estratégias para o controle dos fitonematoides de maneira mais eficiente, utilizando a biotecnologia para a produção de cultivares geneticamente modificadas de importância econômica, seja utilizando RNA interferente para diminuir a expressão de genes essenciais ao nematoide, ou superexpressando proteínas de resistência aos parasitas, para desenvolver mais uma ferramenta para o controle integrado de fitonematoides, e principalmente, neste caso, de *M. incognita*.

## VII - PERSPECTIVAS

No capítulo 1 deste trabalho foram descritos dados a respeito da(s) função (ões) de proteases que estão envolvidas no ciclo de vida do fitonematoide *M. incognita* e da importância destas enzimas proteolíticas no sucesso de parasitismo deste nematoide. O próximo passo seria localizar espacialmente a expressão dos transcritos dos genes *Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1*, através da técnica de hibridização *in situ*. Em seguida, estudar a morfologia dos sítios de alimentação nas plantas GM através de cortes histológicos, para verificar se há mudanças decorrentes do silenciamento das proteases. E por fim, produzir anticorpos específicos para cada protease, para realização de imunolocalização destas proteases *in planta* para verificar se elas são secretadas pelo nematoide durante o parasitismo e onde são secretadas. Estes dados em conjunto com os que foram obtidos neste trabalho poderão ajudar a entender melhor a função das proteases na interação planta-nematoide.

Além disso, este trabalho testou um método de validação de genes simultâneo a partir de uma mesma construção, que poderá ser utilizado para estudar a função de outros genes que possivelmente estão envolvidos no processo de parasitismo de *M. incognita*. Este método também poderá ser utilizado para combinação de efeitos de silenciamento de genes que já foram validados, para aumentar o efeito deletério nos nematoides e gerar plantas resistentes a *M. incognita* através de transgenia.

Com relação ao capítulo 2 deste trabalho foi relatado que a expressão ectópica em tabaco da proteína 7E12 de *M. incognita* que é expressa na glândula esofágica do nematoide fez com que o parasita estabelecesse mais aceleradamente o sítio de alimentação, confirmando a hipótese de que as proteínas que são produzidas nas glândulas esofágicas desenvolvem funções importantes na interação

planta-nematoide. Neste caso o próximo passo seria a realização de experimentos para descobrir onde esta molécula é secretada, através de estudos de imunolocalização, e com qual molécula da planta a proteína 7E12 interage, através de experimentos, por exemplo, de duplo híbrido de levedura (“Yeast Two Hybrid – Y2H). Além disso, o silenciamento *in planta* da proteína 7E12 poderia verificar se esta proteína seria essencial ao parasitismo do nematoide.

Todos estes estudos reunidos fornecerão bases para elaborar estratégias para o controle mais eficiente e seguro destes patógenos de importância relevante na agricultura mundial.

## VIII – ANEXOS

Artigos como primeiro autor relacionados a tese:

- **Anexo 1:** Ectopic expression of a *Meloidogyne incognita* dorsal gland protein in tobacco accelerates the formation of the nematode feeding site. (publicado em 2011);
- Expression interference of proteases in *M. incognita* via *in planta* RNAi reduces parasitism success. (Em fase de preparação);

Artigos como primeiro autor não relacionados a tese:

- Silencing of a secreted  $\beta$ , 1-4 endoglucanase of *M. incognita* reduces its parasitism rate. (Em fase de preparação)

Artigos como co-autor não relacionados a tese

- **Anexo 2:** Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). (Publicado em 2011).
- **Anexo 3:** Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. (Publicado em 2010).

## **Anexo 1**



## Ectopic expression of a *Meloidogyne incognita* dorsal gland protein in tobacco accelerates the formation of the nematode feeding site

Djair dos Santos de Lima e Souza<sup>a,b,1</sup>, José Dijair Antonino de Souza Junior<sup>a,b,1</sup>, Maíra Grossi-de-Sá<sup>b,d</sup>, Thales Lima Rocha<sup>b</sup>, Rodrigo da Rocha Fragoso<sup>b,c</sup>, Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa<sup>b,d</sup>, Gustavo Ramos de Oliveira<sup>b</sup>, Erich Yukio Tempel Nakasu<sup>b,e</sup>, Bruna Araújo de Sousa<sup>d</sup>, Natália Faustino Pires<sup>b</sup>, Diva Maria de Alencar Dusi<sup>b</sup>, Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro<sup>b</sup>, Eduardo Romano<sup>b</sup>, Janice de Almeida-Engler<sup>f</sup>, Gilbert Engler<sup>f</sup>, Cezar Martins-de-Sá<sup>a</sup>, Maria Fátima Grossi-de-Sá<sup>b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte Final, Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Embrapa Cerrados, BR 020, Km18, Planaltina, DF, Brazil

<sup>d</sup> Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Av. W5, Brasília, DF, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Campus do Vale - Prédio 43421, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup> INRA, UMR Interactions Plantes-Microorganismes et Santé Végétale, 400 Route des Chappes, 06903, Sophia-Antipolis, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 November 2009

Received in revised form 6 September 2010

Accepted 9 September 2010

Available online 16 September 2010

#### Keywords:

Root-knot nematode

Parasitic infection

Nematode's life cycle

Ectopic protein expression

### ABSTRACT

*Meloidogyne* spp., plant-parasitic nematodes present worldwide, are intensively studied because of the damage caused to a large variety of agronomically important crops. Several reports indicate that proteins from the *Meloidogyne* spp. dorsal gland might play an important role to allow proper establishment of a functional nematode feeding site. The precise role of these proteins in the process of feeding cell development is unknown. To gain insights into the function of these secreted *M. incognita* proteins, we constitutively (ectopically) expressed the nematodes dorsal gland protein 7E12 in tobacco plants. It was found that the number of galls at 8 and 16 days after nematode infection was significantly higher in transgenic plants compared to control plants. Eggs from nematodes in transgenic plants hatched faster than those in control plants. Histological analysis of nematode induced galls in transgenic plants clearly shows a different morphology. Giant feeding cells harbor more vacuoles and an increased amount of cell wall invaginations, while neighboring cells surrounding feeding cells are more numerous. These results suggest that the presence of the 7E12 protein in tobacco accelerates gall formation. This assumption is supported by our data illustrating faster gall formation and egg eclosion in transgenic plants.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plant-parasitic nematodes encompass a diverse group of sophisticated pathogens that feed on plant organs like leaves, fruit, flowers, seeds and roots as obligate parasites. Damages caused by phytonematodes such as the root-knot nematodes *Meloidogyne* spp., cyst nematodes *Heterodera* spp. and *Globodera* spp., reach annual rates around US\$125 billion globally [1]. In this scenario, *M. incognita*, a typical root-knot nematode (RKN), appears as the most

harmful plant-parasitic nematode, infecting more than 1700 plant species due to its polyphagous habit [2].

Several adaptations are essential for all phytopathogenic nematodes that are successful parasites, including specialized organs such as, cuticular structures, amphids, the stylet, esophageal glands and their secretions [3]. These structures are essential to allow the root-knot nematode to establish parasitism, by locating the root tip, penetrating the root and finally inducing the formation of a specialized feeding site in the vicinity of the vascular cylinder of the root.

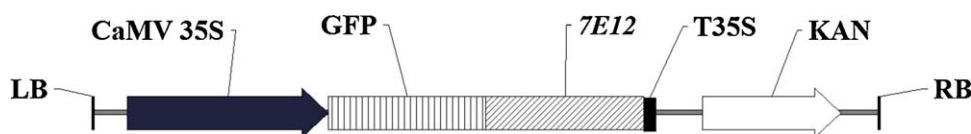
In the beginning of the parasitism cycle, the RKN eggs hatch releasing motile juveniles (J2) along the surface of the root. These J2s move towards the root tip of susceptible roots guided by cuticular structures and secretions from the amphid [4]. These authors used monoclonal antibodies against cuticle and amphidial proteins and confirmed that nematode motility can be affected and cause

\* Corresponding author at: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte Final, Brasília, DF, Brazil. Fax: +55 61 3448 4902.

E-mail addresses: [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br), [fatimagrossidesa@gmail.com](mailto:fatimagrossidesa@gmail.com) (M.F. Grossi-de-Sá).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the article.





**Fig. 1.** Expression cassette showing CaMV 35S promoter followed by green fluorescent protein gene (GFP) fused to 7E12 from *M. incognita* esophageal gland. Kanamycin resistance gene (Kan) was used as selection marker. LB = left border; RB = right border; T35S = terminator.

a delay in root penetration as observed for cyst nematodes. After locating the root tip, worms invade the root by wall-piercing using their stylet and release a mix of hydrolases such as glucanases, xylanases and pectinases from their esophageal subventral glands to digest the plant cell wall and middle lamella polymers [5–7]. The importance of these enzymes during root invasion was clearly demonstrated by Chen et al. [8]. They showed that the knock-down of the cyst nematode *Globodera rostochiensis*  $\beta$ -1,4-endoglucanase using RNA interference (RNAi), resulted in the reduced ability of the nematode to invade *Solanum tuberosum* roots. Despite the obvious role of hydrolytic enzymes for nematode penetration, no information is available on the mechanism of nematode migration or feeding cell establishment [3].

Several studies contributed to the identification of potential signal molecules involved in the mechanisms of RKN parasitism. The first described and well characterized protein was the *M. javanica* chorismate mutase I [9]. This metabolic enzyme secreted by the nematode was ectopically expressed in transgenic soybean roots, and induced a phenotype of reduced and aborted lateral roots. It was speculated that this phenotype is caused by chorismate degradation in the cytoplasm reducing plastid auxin levels, leading to alterations in the shikimate pathway [9]. Another regulator described in *Heterodera glycines* esophageal gland was designated Hg-SYV4, a secretory peptide related to the CLAVATA3/ESR family. Hg-SYV4 down-regulates the expression of the transcription factor WUSCHEL, upon constitutive expression in transgenic *Arabidopsis* plants [10]. These lines were characterized by a reduction of stem cell population, a premature termination of the shoot apical meristem and the development of flowers lacking the central gynoecium [10]. Furthermore, the expression of a secreted peptide from *M. incognita* called 16D10, stimulates root growth in *Arabidopsis*, supposedly via an interaction with SCARECROW-like transcription factors [11]. Taken these studies together, it is feasible to conclude that nematode secreted proteins can affect plant cell functions and to suggest an active role of nematode compounds in the development of feeding sites.

It is generally accepted that phytopathogenic nematodes release signals in plant tissues during their parasitism cycle, called parasitism effectors. The role of these parasitism effectors in the adaptation of plant cells to allow nematode development was addressed by Zinov'eva et al. [12]. The induction of multinucleated giant cells is also mediated by the secretion of these parasitism effectors and by yet unknown mechanisms of plant gene expression reprogramming [13].

Our report focuses on nematode parasitism factors and the process by which these factors might contribute to the differentiation of plant host cells and the establishment of the parasitism.

Due to the obvious implications of the nematode esophageal glands in parasitism, subventral and dorsal gland products are intensively studied [14,15]. cDNA libraries from the cytoplasmic content of these glands revealed that the majority of the potential parasitism genes have no similarities with known proteins and are therefore referred to as novel genes [16].

We chose the 7E12 protein from the *M. incognita* cDNA library produced by Huang et al. [16], to gain insight about its role, because it possibly functions as an effector of *M. incognita* parasitism like the 16D10 protein, for example, as described by Huang et al. [11].

Here we present data illustrating that the ectopic expression of 7E12, is able to stimulate faster feeding cell development in transgenic tobacco plants and results in an overall faster hatching of the RKN eggs. These data open new possibilities to engineer resistance against nematodes in agricultural important crops.

## 2. Methods

### 2.1. cDNA amplification and whole-mount in situ hybridization

First, cDNA was prepared using RNA extracted from *M. incognita* females according Gao et al. [15], using the SuperScript™ II (Invitrogen™) kit, following the manufacturer's instructions. Then, primers to clone the 7E12 cDNA were designed using the 7E12 mRNA sequence deposited in GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.org>) under the accession number AF531166. The cDNA was cloned into the pGEM-T easy vector (Promega - Madison, WI, USA).

To evaluate the spatial distribution of the gene expression, we used the in situ hybridization technique. Briefly, sense and anti-sense RNA probes were labeled with digoxigenin using the DIG RNA labeling kit (SP6/T7) (Roche). Probes were made by reverse transcription of cloned fragments in pGEM-T easy vector. Probe labeling was performed following the manufacturer's instructions. *M. incognita* females were extracted from roots according to Hussey and Barker [17], separated by individual pipetting and fixed with 2% paraformaldehyde solution. The in situ hybridization was performed as described by de Boer et al. [18].

### 2.2. Cloning of *M. incognita* 7E12 cDNA for expression in plants

The 7E12 cDNA was cloned from *M. incognita* females. The RNA was extracted and amplified as previously described. For cloning purposes, we used the Gateway system (Invitrogen™) following the manufacturer's instructions. Briefly, cDNA from the *M. incognita* 7E12 gene was amplified without the signal peptide, using the primers Mi7F (5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGC AGG CGA TCG AAA TGC ATC 3') and Mi7R (5'GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA AAC AGT ATT AGC TCT TCC 3'). The PCR product was purified, subcloned in the pDONR™ 221 vector (Invitrogen™), and subsequently subcloned in the binary vector pK7WGF2 [19] for expression of GFP fusions in plants. The expression construct was composed of the GFP gene fused with the 7E12 gene driven by the CaMV 35S promoter. The expression cassette also contains the 35S terminator and the nptII gene as a Kanamycin selection marker (Fig. 1). All constructs were checked by sequencing.

### 2.3. Plant transformation and selection

The construct for ectopic expression of the 7E12 cDNA in tobacco plants was electroporated into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. The transformed *A. tumefaciens* cells were co-cultured with *Nicotiana tabacum* (var. Xantii) leaf discs. The material was subsequently multiplied *in vitro* according to the method described by Horsch et al. [20]. DNA and RNA extracted from *N. tabacum* (T1) plants was used to perform PCR and RT-PCR analysis in order to

verify the presence of GFP:7E12 fusion in the genomic DNA and transcripts, respectively, in the transgenic plants.

#### 2.4. Nematode inoculum and infection

The *M. incognita* inoculum was carried out in *N. tabacum* (var. Xantii) transgenic (two independent events of transformation were selected with 16 repetitions each) and control plants (16 repetitions) cultivated in a greenhouse. *M. incognita* eggs were extracted according Hussey and Barker [17]. The egg suspension was submitted to a modified Baermann funnel technique in a distilled water recipient for hatching of second stage juveniles (J2) at room temperature during 48 h. J2 stages were harvested by centrifugation at  $700 \times g$  for 5 min and quantified in a Peters chamber. Each plant was inoculated with 600 J2.

In order to verify the eclosion of J2 nematodes at the end of its life cycle, forty egg masses were harvested 45 days after infection (DAI) from transgenic and non-transgenic *N. tabacum* plants and transferred to individual eclosion chambers. After 24 and 48 h the J2 were counted in a light microscope.

#### 2.5. Sample preparations and microscopy analysis

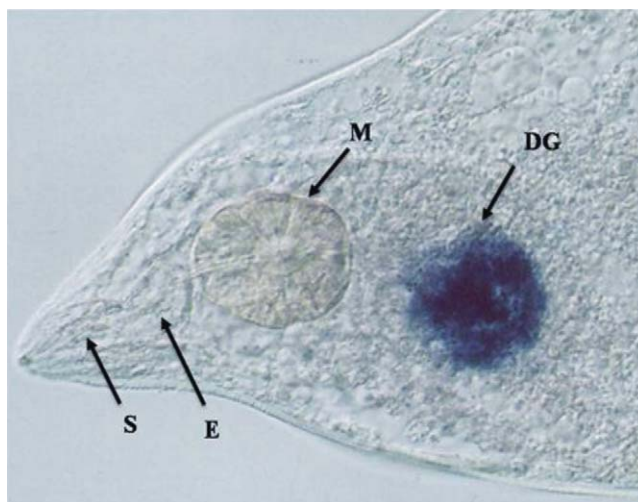
The *N. tabacum* roots from transgenic and non-transgenic plants were assayed at 8, 16 and 28 DAI with five samples from the apical meristem and the secondary root internodes collected from each plant. Root segments were fixed with 2% glutaraldehyde, dehydrated in ethanol at 10, 30, 50, 70, 90 and 100%, and infiltrated with Technovit 7100 (EMS cat. no. 14655) resin according to the manufacturer. Polymerized blocks were cut using a microtome (2–4  $\mu\text{m}$ ) and subsequently stained with toluidine blue for microscopic visualization.

#### 2.6. Protein extraction and immunodetection by dot blot

Aqueous protein extracts were prepared from 1 g of roots from both transgenic and non-transgenic plants of *N. tabacum*, 16 days after inoculation with *M. incognita* J2, triturated in a final volume of 1.5 ml of extraction buffer (100 mM sodium phosphate, 20 mM sodium chloride, 2 mM DTT, 0.1% PMSF, pH7.0). Root protein extracts were kept under soft agitation at 4 °C for 2 h. The samples were then centrifuged at  $8000 \times g$  for 30 min. Protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford method [21] and the protein profile was determined via 12% SDS-PAGE [22]. Root aqueous extracts were acetone precipitated as described in [23] with final amounts ranging between 50 and 400  $\mu\text{g}$  for each plant. Samples were resuspended in 50  $\mu\text{L}$  PBS buffer (1 $\times$ ) and transferred to an Imobilon-P membrane, using a vacuum concentrator (BioRad). Protein transfer was carried out overnight at continuous agitation at 4 °C employing 0.09 V/30 mA in a Bio-Rad wet transfer system. The membrane was placed on a 50 ml tube covered with aluminum foil and blocked with a PBS solution for 2 h at 4 °C. Afterwards, the membrane was washed three times with PBS buffer (pH 7.0) containing 5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, Tween 20 (1%), and milk (1%) and incubated overnight with a 1:5000 dilution of an anti-GFP Rabbit IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (Alexa - Invitrogen) under continuous agitation at 4 °C. Finally the membrane was washed three times with PBS buffer (pH 7.5) containing 5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl and Tween 20 (1%) and analyzed with a fluorescence microscope (Zeiss AxioImager).

#### 2.7. Statistical analysis

In order to compare and evaluate the number of galls, egg masses, hatched J2's and root dry weight of control and 7E12 plants,



**Fig. 2.** *In situ* localization of 7E12 mRNA within female adults dorsal esophageal gland cells of *M. incognita*. DG, dorsal esophageal gland; S, stylet; E, esophagus; M, metacarpus.

ANOVA and Tukey's mean comparison test from SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL) were used for statistical analysis.

### 3. Results

#### 3.1. *In situ* hybridization

In order to study the expression profile of 7E12 in *M. incognita*, we performed *in situ* hybridization using the 7E12 itself as the probe. Fig. 2 presents a tissue slice of an adult nematode female. The stylet (S), esophagus (E), metacarpus (M) and dorsal esophageal gland (DG) are depicted. *In situ* hybridization of the 7E12 probe shows a strong and specific signal at the dorsal gland, confirming similar results obtained by Huang et al. [16] that the 7E12 protein is specifically transcribed in the *M. incognita* esophageal dorsal gland.

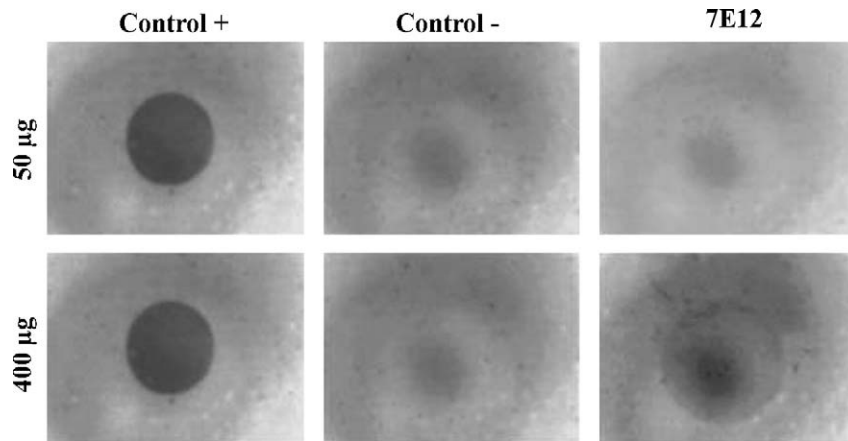
#### 3.2. Dot blot analysis confirms the presence of 7E12:GFP fusion protein

PCR positive and kanamycin-resistant T1 plants (data not shown) were selected to verify the expression of the gene construct 7E12, by dot blot. In a first assay, aliquots of 50  $\mu\text{g}$  of root protein extracts were used from transgenic and non-transgenic plants and probed with anti-GFP antibody. Fig. 3 shows that under these conditions, only the positive control shows a positive immunoreaction. However in a dot blot assay using an 8-fold concentrated root protein extract (400  $\mu\text{g}$ ), the presence of a faint GFP signal can also be observed in the 7E12 event. Negative controls were completely negative, whereas GFP controls showed a clear positive immunoreaction (Fig. 3). All the other events showed the same signal in dot blot assays (data not shown).

Based on these results, we conclude that although present in root cells, the cellular concentration of the fusion protein is far too low for proper imaging of its fluorescence in living roots.

#### 3.3. Macroscopic and microscopic analyses of transgenic roots phenotype

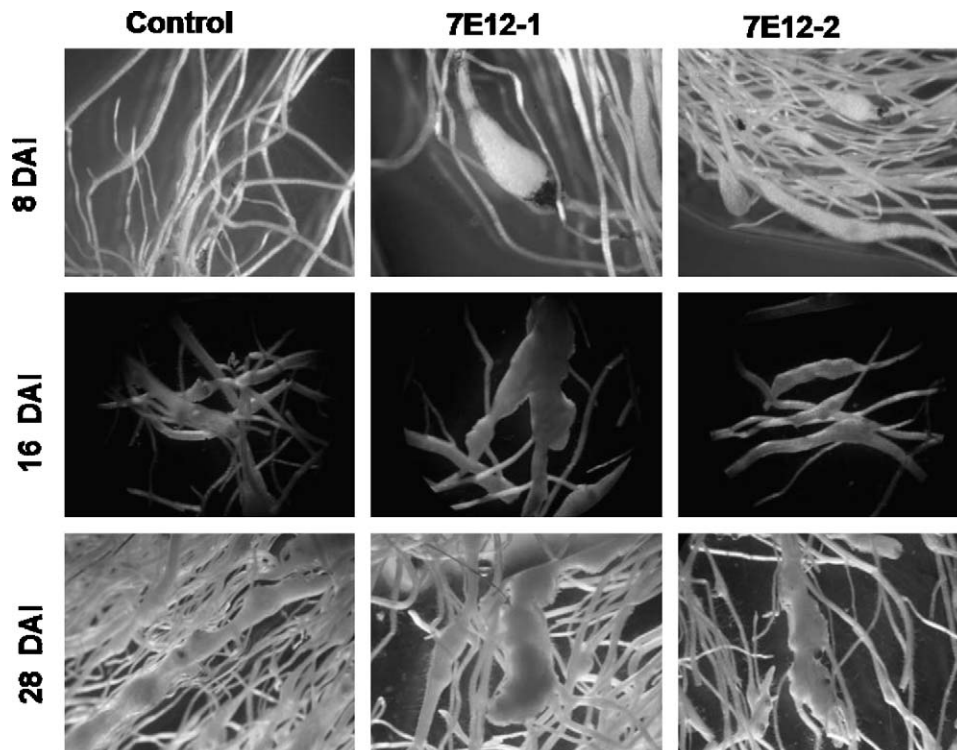
We performed our analyses in tobacco plants because it is a well established plant model in our laboratory. It also has the advantage over *Arabidopsis* plants when we consider the number and weight of the roots, which facilitates the macroscopic analysis of the nematode infection assays.



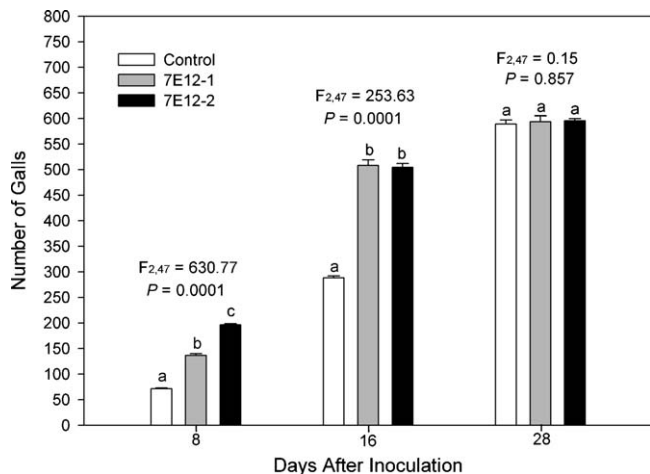
**Fig. 3.** Dot blot using a fluorescent labeled anti-GFP antibody. Positive controls represent 50 and 400 µg of a transgenic *Nicotiana tabacum* expressing free GFP. The negative controls represent 50 and 400 µg of a non-transgenic *N. tabacum* root galls protein extract. Dot blots from 7E12 plant extracts were made with 50 and 400 µg of protein obtained from plants 15 DAI.

For the phenotypic evaluation, we used the two independent transformation events of *N. tabacum*, 7E12-1 and 7E12-2, which were produced by *Agrobacterium* transformation. These events were selected for their kanamycin resistance due to the presence of the marker gene *nptII* in the pK7WGF2 vector. The seeds from these two events (T0) were also selected in the presence of kanamycin because the T1 generation is segregating. Those seeds that were able not only to germinate, but also to develop roots in the presence of kanamycin, were selected and submitted to PCR and RT-PCR in order to assess the presence of the 7E12 gene and transcript, respectively (data not shown). We used non-transformed plants as negative controls. We used 16 replicates for each treatment, including the two 7E12 events, all checked for the presence of GFP: 7E12, and control plants.

The macroscopic analyses were performed 25 days after germination. Our results showed that the plants do not show any apparent phenotypic differences in relation to the non-transformed plants when not infected by nematodes (data not shown). However, the comparison of roots from transgenic and non-transformed *N. tabacum* infected with *M. incognita* J2 and collected 8, 16 and 28 DAI, clearly illustrated a different morphology and size of the RKN galls (Fig. 4). Eight DAI, events 7E12-1 and 7E12-2 showed larger and more elongated galls as compared to control plant roots (Fig. 4). In 16 DAI plants, galls from events 7E12-1 and 7E12-2 were significantly bigger than control galls. It was observed an obvious difference in gall morphology between 7E12 transgenic events and control galls in all analyzed stages. These results suggest that galls developed faster in transgenic plants than in control plants.



**Fig. 4.** *Nicotiana tabacum* roots inoculated with second stage juvenile (J2) of *Meloidogyne incognita*. The roots were collected after 08, 16 and 28 DAI.



**Fig. 5.** Number of galls after 8, 16 and 28 DAI. The number of galls were counted and compared with control plants. Sixteen replicate plants were counted. Bars indicate the standard error of each group and different letters mean statistical difference between groups by Tukey's means comparison test.

Statistical analysis showed that the number of galls between control and transformed events, both harvested at 8 and 16 DAI, was significantly different (Fig. 5). The average number of galls observed for each plant at 8 and 16 DAI was almost twice the number in control plants. However, at 28 DAI, the number of galls was quite similar (Fig. 5). Both 7E12 plants showed a higher number of galls with modified morphology of the largest galls. This observation suggests that the process of gall formation is accelerated in the 7E12 events, corroborating our morphological data.

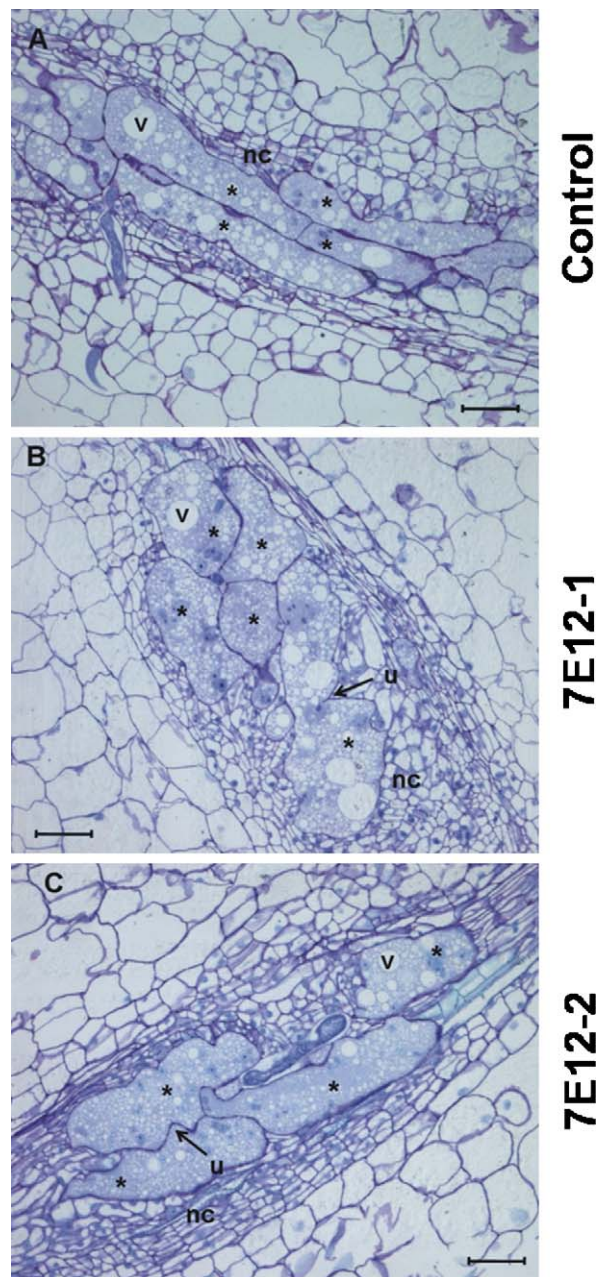
Microscopic analysis of tissue sections showed that giant cells are slightly different in size and morphology when comparing control with transgenic events at 8 DAI. Galls from both 7E12 events contain giant cells with more undulated walls and a larger number of small sized vacuoles (Fig. 6). Furthermore, it was observed that the neighboring cells surrounding the feeding cells are much more numerous in the transgenic events than in control galls (Fig. 6).

Resistance tests carried out on samples 45 DAI showed that the number of egg masses of the two 7E12 events and control plants were statistically not different (data not shown) yielding an average of 500 egg masses per plant. Additionally, the dry weight of roots from the 7E12 events was around 120 mg and similar to those from control plants (data not shown). Although an accelerated gall formation could be observed in 7E12 plants until 28 DAI, the final number of galls at 45 DAI was not different between 7E12 events and control plants.

The analysis of egg hatching carried out with eggs harvested 45 DAI from 7E12 and control plants showed a higher number of hatched J2's for the 7E12-1 and 7E12-2 eggs than control eggs after 24 and 48 h (Fig. 7). The number of hatched J2's from event 7E12-2 was also higher than the number for event 7E12-1 (Fig. 7). This result suggests that egg maturation in 7E12 transformed plants at 45 DAI is faster in comparison to eggs in control plants, as a result of an accelerated female development.

#### 4. Discussion

This study evaluates the role of the novel gene *7E12* in the *M. incognita* parasitism process. To do so, a construct containing a fusion of *7E12* cDNA with GFP was generated to ectopically over-express the *7E12* protein in tobacco plants. Protein *7E12* was first isolated and described by Huang et al. [16] using a cDNA library from *M. incognita* esophageal glands. To identify and characterize differentially expressed nematode genes in phytopathogenic

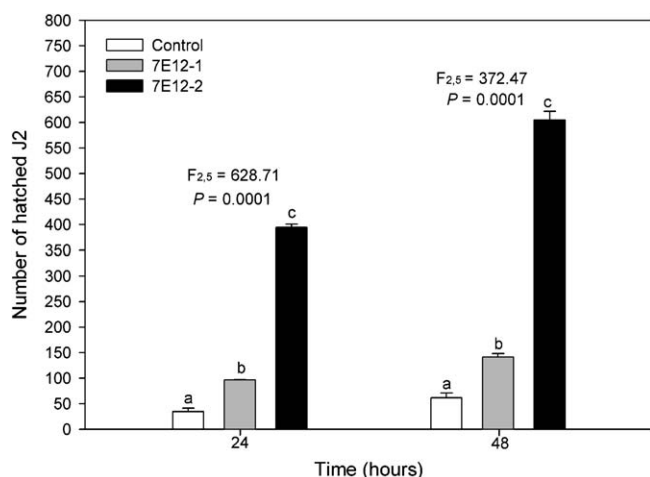


**Fig. 6.** Bright-field images from giant cells after toluidine blue-staining of control and 7E12 transformed *N. tabacum* galls, eight DAI with *M. incognita*. (A) Control plant; (B) and (C) 7E12-1 and 2 plants. nc, neighboring cells; v, vacuoles; u, undulations; \*, giant cell; bar, 100  $\mu$ m.

and non-phytopathogenic nematodes is an important strategy to study the vital biological processes involved in the nematode's life cycle such as feeding, development, signaling, reproduction and longevity [24,25] as well as for the better understanding of the host–parasite interactions [26].

In this work, we used a gene construct in fusion with a GFP gene reporter in order to localize the 7E12 protein in plant roots. The very low expression level of this fusion protein, however, prevented us from detecting GFP fluorescence of the 7E12:GFP fusion protein in transgenic events using confocal microscopy.

Dot blot analysis, on the other hand, confirmed the presence of the GFP protein in extracts from the 7E12 transgenic events. Despite of the low concentration of GFP and probably 7E12 protein in roots, its presence causes a profound effect on the development



**Fig. 7.** Evaluation of J2 eclosion from control and transformed *N. tabacum* plants, 45 DAI. The number of hatched J2 was determined 24 and 48 h after egg mass removal. Bars indicate the standard error of each group and different letters represent statistical differences between the groups using the Tukey's means comparison test.

of giant cells. As controls, we used non-transformed plants. It is well established in the literature that neither the CaMV35S promoter nor GFP protein expression affect the life cycle of *M. incognita* [27]. It was observed that galls were induced earlier in transgenic plants than in the control plants. Moreover, transgenic events expressing 7E12 always showed an increased number of galls mainly between 8 and 16 DAI. Histological analysis reveal a clear morphological difference between giant cells from the transgenic and the control plants. Transgenic events giant cells contain more numerous, but smaller vacuoles, and are surrounded by a higher number of neighboring cells. Also, giant cells in the transgenic events were characterized by more undulated cell walls. These histological data suggest a faster maturation of feeding cells in plants that ectopically express the 7E12 protein. Finally at 28 DAI, no significant difference of the number of galls was observed when compared with wild type plants. These data suggest that *M. incognita* dorsal gland 7E12 protein has an important role in establishing a compatible interaction between the plant and the nematode at an early stage. The 7E12 protein probably acts early during the infection process by stimulating giant cell formation which, in turn, leads to a faster development of the nematode feeding site. This hypothesis is supported by the observation that a higher number of hatched J2 nematodes were found in the transgenic events at 24 and 48 h DAI, indicating faster hatching when compared to control plants.

To our knowledge, this is the first report describing a *M. incognita* dorsal gland protein that upon ectopic expression in a plant is able to accelerate feeding site development. The nematode secreted 7E12 protein responsible for this phenotype shows no identity with any protein of known function using BLASTn and BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) [28]. As such, the potential function for this protein remains unknown. However, it is known that the 7E12 gene is exclusively transcribed in the *M. incognita* dorsal gland [16] at a time point between host root penetration and nematode feeding site induction, which corresponds with proteinaceous granule accumulation in the developing dorsal gland of the parasite. This fact provides evidence that the dorsal gland of sedentary endoparasite phytonematodes is probably a major site responsible for the synthesis of essential parasitism factors related to host cell control [3].

Another finding that supports this hypothesis is described by Huang et al. [11], in which it is showed that a small peptide named 16D10, expressed by the *M. incognita* dorsal gland, was ectopically expressed in *Arabidopsis* and resulted in an increase of the cell divi-

sion rate in root meristems. The mature 16D10 peptide was similar to the C-terminal conserved motif of the plant CLE protein family [29,30]. Moreover, two SCARECROW-like transcription factors of the GRAS protein family were suggested as the putative targets of this nematode protein.

Taking these results together, we hypothesize that the 7E12 protein has a similar interaction with some protein involved in the cell division process. However, the lack of information about 7E12, which has no similarity with any protein of known function, neither a motif nor domain identified in its amino acid sequence, prevented us to derive a more solid hypothesis concerning its function.

To validate our results and to gain insight into the function of the 7E12 protein, we are currently generating knockouts and knock-downs of this gene using the RNAi strategy. In addition, it will be important to identify the target(s) of 7E12 in plants. The understanding of the mechanism of nematode parasitism proteins will undoubtedly aid in the development of better strategies to control resistance against phytopathogenic nematodes.

## Acknowledgments

We are grateful to CNPq, CAPES, FAP-DF, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Brazil) and INRA (France) for grants, scholarships and financial support to this study.

## References

- [1] D.J. Chitwood, Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, *Pestic. Manag. Sci.* 59 (2003) 748–753.
- [2] C.J. Lilley, P. Devlin, P.E. Urwin, H.J. Atkinson, Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants, *Parasitol. Today* 15 (1999) 414–417.
- [3] T.J. Baum, R.S. Hussey, E.L. Davis, Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism, *Genet. Eng. (NY)* 28 (2007) 17–43.
- [4] L. Fioretti, A. Porter, P.J. Haydock, R. Curtis, Monoclonal antibodies reactive with secreted-excreted products from the amphids and the cuticle surface of *Globodera pallida* affect nematode movement and delay invasion of potato roots, *Int. J. Parasitol.* 32 (2002) 1709–1718.
- [5] S. Jaubert, J.B. Laffaire, P. Abad, M.N. Rosso, A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *FEBS Lett.* 522 (2002) 109–112.
- [6] T.N. Ledger, S. Jaubert, N. Bosselut, P. Abad, M.N. Rosso, Characterization of a new beta-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases, *Gene* 382 (2006) 121–128.
- [7] M. Mitreva-Dautova, E. Roze, H. Overmars, L. de Graaff, A. Schots, J. Helder, A. Govers, J. Bakker, G. Smant, A symbiont-independent endo-1,4-beta-xylanase from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 19 (2006) 521–529.
- [8] Q. Chen, S. Rehman, G. Smant, J.T. Jones, Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi, *Mol. Plant Microbe Interact.* 18 (2005) 621–625.
- [9] E.A. Doyle, K.N. Lambert, *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development, *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 (2003) 123–131.
- [10] X. Wang, M.G. Mitchum, B. Gao, C. Li, A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Plant Pathol.* 6 (2005) 187–191.
- [11] G. Huang, R. Dong, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor, *Mol. Plant Microbe Interact.* 19 (2006) 463–470.
- [12] S.V. Zinov'eva, N.I. Vasiukova, O.L. Ozeretskovskaia, Biochemical aspects of plant interactions with parasite nematodes. (A review), *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 40 (2004) 133–142.
- [13] G. Gheysen, C. Fenoll, Gene expression in nematode feeding sites, *Annu. Rev. Phytopathol.* 40 (2002) 191–219.
- [14] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 (2003) 720–726.
- [15] B. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 (2001) 1247–1254.
- [16] G. Huang, B. Gao, T. Maier, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, R.S. Hussey, A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 (2003) 376–381.

- [17] R.S. Hussey, A.A. Barker, Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique, *Plant Dis. Reporter* 57 (1973) 1025–1028.
- [18] J.M. de Boer, Y. Yan, G. Smant, E.L. Davis, T.J. Baum, In-situ hybridization to messenger RNA in heterodera glycines, *J. Nematol.* 30 (1998) 309–312.
- [19] M. Karimi, D. Inze, A. Depicker, GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 193–195.
- [20] R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffman, M. Wallroth, D.Z. Eichholtz, S.G. Rogers, R.T. Fraley, A simple and general method for transferring genes into plants, *Science* 227 (1985) 1229–1231.
- [21] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [22] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [23] B.D. Hames, D. Rickwood, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK, 1981.
- [24] I. Antoshechkin, P.W. Sternberg, The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 518–532.
- [25] A. Mukhopadhyay, H.A. Tissenbaum, Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 65–71.
- [26] G. Gheysen, B. Vanholme, RNAi from plants to nematodes, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 89–92.
- [27] P.E. Urwin, S.G. Moller, C.J. Lilley, M.J. McPherson, H.J. Atkinson, Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 10 (1997) 394–400.
- [28] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [29] J.M. Cock, S. McCormick, A large family of genes that share homology with CLAVATA3, *Plant Physiol.* 126 (2001) 939–942.
- [30] A.N. Olsen, K. Skriver, Ligand mimicry? Plant-parasitic nematode polypeptide with similarity to CLAVATA3, *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 55–57.

## **Anexo 2**



## Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer

Kilvia I.C. Craveiro<sup>a,b,c</sup>, José Edilson Gomes Júnior<sup>a,b</sup>, Maria Cristina M. Silva<sup>a</sup>, Leonardo L.P. Macedo<sup>a,d</sup>, Wagner A. Lucena<sup>a,e,f</sup>, Marília S. Silva<sup>g</sup>, José Dijair Antonino de Souza Júnior<sup>a,b</sup>, Gustavo R. Oliveira<sup>a,e,i</sup>, Mariana T. Quezado de Magalhães<sup>a,e</sup>, Antônio D. Santiago<sup>h</sup>, Maria Fatima Grossi-de-Sa<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Embrapa Transferência de Tecnologia, PqEB-Final Av. W5 Norte, CEP 70770-901, Brasília, DF, Brazil

<sup>d</sup> Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916-Av. W5 Norte, CEP 70790-160, Brasília, DF, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, CP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup> Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz 1143, Centenário, CP 174, Campina Grande, PB, Brazil

<sup>g</sup> Embrapa Cerrados, BR 020 Km 18, CP 08223, CEP 73310-970, Planaltina, DF, Brazil

<sup>h</sup> Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Jardins, CP 44, CEP 49025-040, Aracaju, SE, Brazil

<sup>i</sup> Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 August 2009

Received in revised form 3 November 2009

Accepted 12 November 2009

#### Keywords:

*Telchin licus licus*

*Bacillus thuringiensis*

*Saccharum officinarum*

Brush Border Midgut Vesicles

Phage-display

Molecular modelling

### ABSTRACT

Sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*) is a serious sugarcane pest in Americas whose endophytic lifestyle hampers effective chemical and biological controls. Therefore, development of alternative control methods is extremely important. Envisaging development of transgenic plants resistant to this pest, we investigated the effect of the *Bacillus thuringiensis* Cry protein Cry1Ia12synth (truncated protein lacking C-terminus with plant codon usage) and variants against *T. l. licus*. *cry1Ia12synth* gene was used to generate mutated variants, which were screened for toxicity toward *T. l. licus*. For that purpose, an innovative technique combining *cry* gene shuffling with phage-display was used to build a combinatorial library comprising  $1.97 \times 10^5$  Cry1Ia12synth variants. Screening of this library for variants binding to *T. l. licus* Brush Border Midgut Vesicles led to the identification of hundreds of clones, out of which 30 were randomly chosen for toxicity testing. Bioassays revealed four variants exhibiting activity against *T. l. licus* as compared to the non-toxic Cry1Ia12synth. Eight single substitutions sites were found in these active variants. Based on theoretical molecular modelling, the probable implications of these mutations are discussed. Therefore, we have four genes encoding Cry1Ia12synth variants active against *T. l. licus* promising for future development of resistant transgenic sugarcane lines.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Despite technological advances, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) culture still faces several phytosanitary problems and plant predators. Sugarcane giant borer, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), is one of the most important insect pests of the sugarcane crop, occurring in several countries of the Americas (Mendonça et al., 1996). The *T. l. licus* caterpillar develops inside the sugarcane stem, survives from one season to the next and causes significant annual economical losses (Mendonça, 1982). This endophytic lifestyle hampers the effectiveness of chemical,

mechanical and biological control methods. The damage caused by this insect pest involves destruction of the basal internodes, reduction of sucrose, and formation of galleries that may compromise the entire diameter of the stem. This facilitates secondary infections by other insects and even more frequently by microorganisms (Mendonça et al., 1996). Therefore, the search for new alternatives for the control of this pest is of great importance for sugarcane producers.

In this context, a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) encoded entomotoxic protein (Cry) has been investigated for potential control of sugarcane giant borer neonate larvae. *Bt* is an aerobic, gram-positive bacterium that synthesizes crystalline inclusions during its sporulation that are composed of one or more Cry toxins and/or Cyt toxins (Höfte and Whiteley, 1989; Silva-Werneck and Ellar, 2008). Cry toxins are presently classified into 58 types (Cry1–Cry58) and many sub-types (e.g. Cry1Aa and Cry1Ba) based on their amino acid sequence similarity. They are active against a limited number of

\* Corresponding author at: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte s/n, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil.  
Tel.: +55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3624.

E-mail address: [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br) (M.F. Grossi-de-Sa).



susceptible insect species (including lepidopterans, coleopterans and dipterans) and also against nematodes (Bravo and Soberón, 2008). A major group of Cry toxins is the three-domain (3D)-Cry family, members of which share similarities in sequence and structure. At least two different hypotheses have been proposed to explain the mode of action of these toxins, one relating to formation of pores in the target insect midgut and the other involving signal transduction. For both models, the first step is similar, i.e. the crystals are ingested by the larvae and solubilised in the midgut into protoxins. These are cleaved by midgut proteases to give rise to an active 60 kDa 3D-Cry toxin. The activated toxin binds to a cadherin receptor that is located in the midgut microvilli (Bravo and Soberón, 2008). The pore formation model suggests that this interaction with a cadherin receptor facilitates the proteolytic removal of the Cry  $\alpha$ 1-helix, triggering toxin oligomerisation that results in pore formation, causing larval death. In contrast, the signal transduction model proposes that binding of monomeric toxin to a cadherin receptor activates an adenyl cyclase/protein kinase A magnesium-dependent signalling pathway, resulting in cell lysis (Bravo and Soberón, 2008; Zhang et al., 2006).

The spectrum of insects controlled by *Bt* can be broadened by directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling (Lassner and Bedbrook, 2001). DNA shuffling coupled with the phage-display technique has been valuable for the generation of genetic diversity and for selection of variants showing binding affinity to specific protein targets. DNA shuffling is an *in vitro* recombination method that uses small homologous DNA sequence fragments as substrates for PCR reactions, aiming to produce populations of gene variants (Stemmer, 1994; Zhao and Arnold, 1997). This technique has been used for several applications in different fields, including the generation of new molecules conferring resistance to insect pests (Patten et al., 1997). The phage-display approach involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target (Willats, 2002).

In a previous study, it was reported that Cry11a12 protein exhibits considerable toxicity against the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), indicating a potential for activity against other lepidopteran species (Grossi-de-Sa et al., 2007). Since the *cry11a12* gene was isolated by our research group and our bank of *cry* genes is still under construction, the *cry11a12* gene was therefore used to initiate the prospection and development of Cry toxins against *T. l. licus*. For this purpose, the nucleotide sequence of the original *cry11a12* gene was first changed to accommodate plant codon usage, resulting in *cry11a12synth*. Considering that Cry11a12synth is not toxic to *T. l. licus*, the aim of this work was to use the *cry11a12synth* gene to generate and select protein variants with toxicity towards *T. l. licus*. Then, DNA shuffling coupled with phage-display was used to generate a *cry11a12synth* combinatorial library. Screening of this combinatorial library for *cry11a12synth* variants that bind to Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) of *T. l. licus* resulted in the identification of new *cry11a12synth* molecules with entomotoxicity towards sugarcane giant borer larvae.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Midgut dissection

*T. l. licus* second and third instar larvae, available in the field solely during part of sugarcane season, were collected in a sugarcane plantation in Maceió, AL, Brazil. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET buffer (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Then, midguts were centrifuged at 2500  $\times$  g for 5 min at 4 °C, the pellet was washed twice with MET buffer. The

resulting pellet, enriched with midguts, was stored at –80 °C until use.

### 2.2. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMVs)

Preparation of BBMVs from the dissected midguts of *T. l. licus* larvae was performed by using the precipitation method described by Wolfersberger et al. (1987). The concentration of BBMVs proteins was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve.

### 2.3. *cry11a12synth* gene

Previously, the *B. thuringiensis* S811 Brazilian strain, obtained from the collection of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, was used to isolate the *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) (GenBank accession no. AY788868). For the present work, the original *cry11a12* nucleotide sequence coding solely for the truncated toxin (lacking the C-terminus, i.e. consisting of the N-terminus and the domains I–III) was changed in order to accommodate plant genetic codon usage and named *cry11a12synth*. The *cry11a12synth* gene (1944 bp) was synthesized by Epoch Biolabs, Texas, US and cloned into the pBluescript II vector (Stratagene). The resulting sequence of *cry11a12synth* gene was deposited in the NCBI gene databank under accession number FJ938022.

### 2.4. DNA shuffling

First, the *cry11a12synth* gene was excised from the pBluescript II harbouring vector by digestion at 37 °C for 16 h under the following conditions: 5  $\mu$ g plasmid DNA, 10 U *Not* I (Promega), 20 U *Sal* I (New England Biolabs), 1  $\times$  Buffer D (Promega), 10  $\mu$ g/mL BSA, in a 20  $\mu$ L final volume. The digestion products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis and the fragment corresponding to the *cry11a12synth* insert (1944 bp) was excised and purified from the agarose gel using the GeneClean II Kit (Bio 101). Then, 10  $\mu$ g of the purified *cry11a12synth* gene was digested with 12.5 U of DNase I (Invitrogen) at 15 °C for 15 min and then interrupted by addition of 5  $\mu$ L of 0.5 M EDTA. Resulting fragments of 30–50 bp were jointly purified from a 2.5% agarose gel by using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Ten microlitres of the pool of purified fragments was used as template in a PCR without primers in a 25  $\mu$ L final volume containing 0.4 mM dNTPs, 1 mM MgSO<sub>4</sub> and 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 5 $\times$  Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity buffer. The conditions of the primerless PCR were: 2 min 95 °C; 44 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with a 5 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 7 min at 72 °C. The products of the primerless PCR (1.5  $\mu$ L) were used as template for a second PCR, containing the forward primer *Cry11a12synth*FOR (5'-CCCGG-CCCAGGCGGCCATGAACTCAAGAAC-3') and the reverse primer *Cry11a12synth*REV (5'-CCGGCCGGCCTGGCCTTCGTAAGTAACTTC-3'). Both primers encode a *Sfi* I site, which is adequate for later cloning into the pCOMB3X phagemid (Andris-Widhopf et al., 2000). The second PCR, performed in a 100  $\mu$ L final volume, contained 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.8  $\mu$ M each primer, 5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) and 5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 1 $\times$  Platinum *Taq* Buffer. The conditions for the second PCR were: 2 min 95 °C; 10 cycles: 30 s 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C; followed by 14 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with 20 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 10 min at 72 °C. The second PCR product corresponding to the DNA shuffling product was analysed by 1% agarose gel electrophoresis

and the only band of approximately 1944 bp, corresponding to a population of *cry11a12synth* variants, was excised and purified with the GeneClean II Kit (Bio 101).

### 2.5. Phage display combinatorial library construction

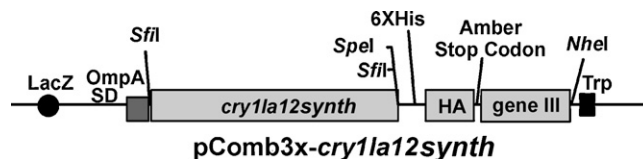
The DNA shuffling product and the pCOMB3X phagemid were both digested with the restriction enzyme *Sfi* I. The resulting digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and purified with the GeneClean II Kit (Bio 101). The purified DNA shuffling product (1 µg) was ligated into the pCOMB3X phagemid (3.5 µg) in a reaction containing 18 U T4 DNA Ligase (Invitrogen) in 200 µL final volume. The ligation product was dialysed, lyophilised, dissolved in 15 µL H<sub>2</sub>O and then fractionated into five aliquots. Each aliquot containing 3 µL was used to transform 60 µL *E. coli* XL1-Blue electrocompetent cells (Stratagene). The procedure was repeated five times and the product of all the bacterial transformations, harbouring the phagemids encoding *cry11a12synth* gene variants, were cultivated for 1 h at 37 °C in SB medium (1% MOPS, 2% yeast extract, 3% tryptone, pH 7.0) containing carbenicillin at 20 µg/mL and tetracycline at 10 µg/mL. Afterwards, carbenicillin was added to 30 µg/mL and the cultivation proceeded for 1 h at 37 °C. M13 fusion phages were then produced by the sequential addition of pre-warmed SB medium at 37 °C, carbenicillin to 38 µg/mL, tetracycline to 7.75 µg/mL and 10<sup>12</sup> plaque-forming units (pfu)/mL of helper phage (VCSM13 Stratagene). The culture was incubated for 2 h at 37 °C under agitation at 250 rpm. After adding 70 µg/mL kanamycin, the culture was incubated for 16 h at 37 °C under agitation at 250 rpm. The resulting M13 phages consisted of fusions between protein III of the phage capsid coding region and the *cry11a12synth* gene. In order to determine the library titre, an aliquot of the original culture was plated on selective LB-agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, pH 7.0, containing 1.4% agar and 100 µg/mL carbenicillin). After incubation at 37 °C for 16 h, the number of plaques was counted and used to calculate the library titre.

### 2.6. Selection of the *cry11a12synth* gene variants (biopanning)

The biopanning procedure was performed as described by Rader et al. (2001), with some modifications. Briefly, at each round, wells in a microtitre plate were coated with BBMV preparation (100 µg) and incubated 16 h at 4 °C. After coating, fusion phages in solution were added and incubated for 2 h at 37 °C. Several washing cycles were performed with PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) containing 0.1% Tween 20. The retained M13 fusion phages were eluted (in 0.2 M glycine, pH 2.2) and used for transfection into *E. coli* cells, to be amplified for further selection rounds. In order to determine the titre of the phage specifically bound to BBMVs that were recovered in each selection cycle, an aliquot of the eluted phage was diluted 100 times and plated onto SB-agar containing 100 µg/mL carbenicillin. The biopanning cycle exhibiting the highest number of colony-forming units (cfus) was taken as the “cycle of enrichment of specifically bound phages”. In this study, the biopanning procedure consisted of five rounds. The clones isolated from the enriched cycles were analysed to verify the integrity of the inserted *cry11a12synth* variant genes via colony PCR, using primers *Cry11a12synth*FOR and *Cry11a12synth*REV. The clones that presented amplicons around 1944 bp in length were further used for expression of *Cry11a12synth* variant proteins.

### 2.7. Expression of *Cry11a12synth* variants in fusion phage

The *cry11a12synth* variants exhibiting size integrity (1944 bp) and the DNA shuffling parental gene *cry11a12synth* were expressed on the surface of M13 phage. Bacteria harbouring the fusion phage



**Fig. 1.** Schematic representation of the expression cassette of the pCOMB3X-*cry11a12synth* phagemid construct, for expression of the protein *Cry11a12synth* displayed on the surface of filamentous M13 phage. Similar constructs containing shuffled *cry11a12synth* inserts were built to display the *Cry11a12synth* variants on the surface of M13 phage particles. LacZ: LacZ inducible operon. SD: One ribosome binding sites (Shine Dalgarno) give rise to separate polypeptides that are directed by the *pelB* signal peptide to the periplasm. OmpA: Signal peptide. *Sfi*I, *Spe*I and *Nhe*I: Restriction sites. *cry11a12synth*: *cry* gene expressed as a fusion with M13 phage protein III (encoded by the virus). 6XHis: Six histidine-tag coding sequence. HA: Epitope for immunodetection by hemagglutinin antibodies. Amber Stop Codon: TAG stop codon that allows production of free and fusion heterologous proteins. gene III: Coding region of M13 phage Protein III. Trp: Transcription termination. Schematic figure adapted from Scott and Barbas (2001).

were cultivated in SB medium containing 100 µg/mL carbenicillin, 5 µg/mL tetracycline and 100 µg/mL kanamycin for 16 h at 37 °C under stirring (250 rpm). The culture supernatant was collected, precipitated with PEG-NaCl (20% Polyethylene-Glycol 8000, 15% NaCl) for 30 min at 4 °C and then centrifuged at 4300 × *g*. The precipitate was dissolved in TBS (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged, and the supernatant (containing the fusion phages) was collected and stored at 4 °C until use. Dot blot analysis by immunodetection of the hemagglutinin (HA) epitope (present in the pCOMB3X phagemid – Fig. 1) fused to the variant proteins was used to evaluate the presence or absence of the *cry11a12synth* variant fusion genes expressed on the phage. The concentration of the recombinant *Cry11a12synth* variant proteins was quantified by ELISA, using a polyclonal rabbit anti-*Cry11* previously obtained in our lab (data not shown).

### 2.8. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

To assess the toxicity of the fusion phage-expressed *Cry11a12synth* and variants to sugarcane giant borer larvae, bioassays were carried out in 96-well microplates. Each well contained a 50 µL mixture of sterilised liquid artificial diet (2% casein, 1% yeast extract, 6% white sugar, 1% ascorbic acid, 1.1% vitamins, 0.75% Wesson salt mixture, 0.03% cholesterol, 0.03% sodium benzoate, 100 µg/mL ampicillin, 0.2% cholin chloride 50% and water) and 10 µg/mL of phage-expressed *Cry11a12synth* or variants deposited on a solid support (1 cm<sup>2</sup> of a commercial porous sponge of 0.5 mm thickness). One *T. l. licus* neonate larva was then placed into each well, and the microplate was incubated at 28 ± 1 °C, 80 ± 10% relative humidity and 12 h photoperiod. For the negative control treatment, the artificial diet without addition of *Cry11a12synth* or variants was used. Each treatment was repeated four times and each replicate contained 10 larvae. After 4 days, percent mortality was recorded for each treatment. Statistical analyses were performed to compare the average percent mortalities by using ANOVA and the Tukey's test at the probability level of 5% (Cruz, 2001).

### 2.9. DNA sequencing

The *cry11a12synth* variant genes that exhibited proteins significant toxicity against *T. l. licus* in the bioassays had their nucleotide sequences determined using a 3130xL Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems). The forward and reverse primers used for sequencing N and C-terminal coding ends were: MMB4 (5'-GCTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3')

and MMB5 (5'-CGTCCATTGCATTCTTTAAT-3'), respectively. The primers TLL3IF (5'-TGTGTCAGCCAATATATCG-3') and TLL3IR (5'-GTTGCCGTGTGGTTCTCTCT-3') were designed to determine the variants' intermediate sequences. The nucleotide sequences were analysed using the BLASTn and BLASTx algorithms (Altschul et al., 1997), available on the web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Sequence alignments were performed by the ClustalW program (Thompson et al., 1994), available on the web (<http://www.expasy.org/>). In order to assemble the sequenced fragments and identify the positions of the mutated residues, the variant sequences were compared with the *cry11a12synth* parental sequence using the Staden Package program (Staden, 1996).

### 2.10. Molecular modelling

Sequence homology to Cry11a12synth was sought in the Protein Database Bank—PDB at the NCBI web site by using BLASTp with default parameters (Altschul et al., 1997). The resulting sequence set was aligned by using MUSCLE (Edgar, 2004) and further analyzed with JALVIEW (Clamp et al., 2004). After manual refinement of the sequence alignment, a homology model of Cry11a12synth and four variants was generated using MODELLER, Version 9.6 (Sali and Blundell, 1993). Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. A rigorous interactive modelling protocol was adopted in which 20 models were constructed and analysed for each variant alignment. These models were analysed for stereochemical properties by using PROCHECK (Laskowski et al., 1993). When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK score was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated by using PyMOL (DeLano, 2002).

## 3. Results

### 3.1. Generation of a *cry11a12synth* combinatorial library

The *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) had its nucleotide sequence modified (hereafter referred to as *cry11a12synth*) to conform to plant codon usage, facilitating its future use in plants for transgenic protection against insect pests. Besides changes in codon usage, the *cry11a12synth* gene coding sequence was also reduced to comprise only the active part of the original *cry11a12* molecule. Thus, the C-terminal domain, known to be dispensable for the toxicity of Cry proteins, was deleted. Consequently, the *cry11a12synth* gene is comprised of a 1944 bp open reading frame encoding a predicted protein of 648 residues, whereas the *cry11a12* gene is 2160 bp long and encodes a protein of 719 amino acids. For DNA shuffling purposes, the purified *cry11a12synth* parental gene was fragmented with DNaseI. The resulting fragments in the 30–50 bp range were recombined by primerless PCR. After a subsequent PCR reaction containing suitable primers to recover mutated *cry11a12synth* sequences, a population of *cry11a12synth* variants was obtained and visualised as a 1944 bp band (data not shown). This band was excised from the gel, purified and cloned into the pCOMB3X phagemid between two *Sfi* I restriction sites (Fig. 1). XL-1 Blue *E. coli* cells transformed with the resulting pCOMB3X-*cry11a12synth* constructs generated a phage-display combinatorial library of *cry11a12synth* variants containing  $1.97 \times 10^5$  colony-forming units (cfu)/mL (Fig. 2).

### 3.2. Selection of *Cry11a12synth* variants binding to *T. l. licus* BBMVs (biopanning)

In order to select the clones expressing Cry11a12synth variants that bind specifically to the *T. l. licus* midgut, the phage-display com-

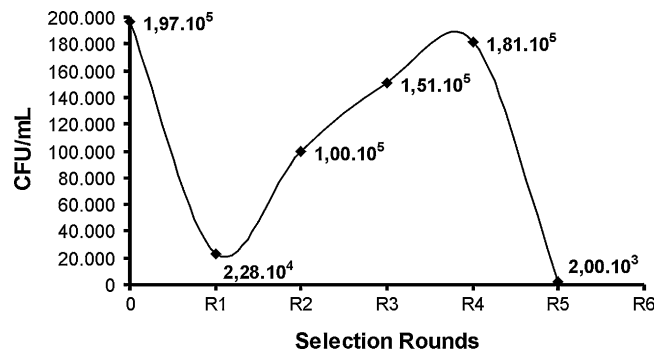


Fig. 2. Biopanning screening of the *cry11a12synth* Phage display combinatorial library for interactions of Cry11a12synth variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) from sugarcane giant borer larvae (*T. l. licus*). The graph shows the number of phage-infected bacterial colonies obtained from each round of biopanning. In the second and third rounds of biopanning occurred the enrichment of recombinant phages displaying Cry11a12synth variants specifically bound to *T. l. licus* BBMVs. The points of the curve indicate the library titres in colony-forming units (cfu)/mL.

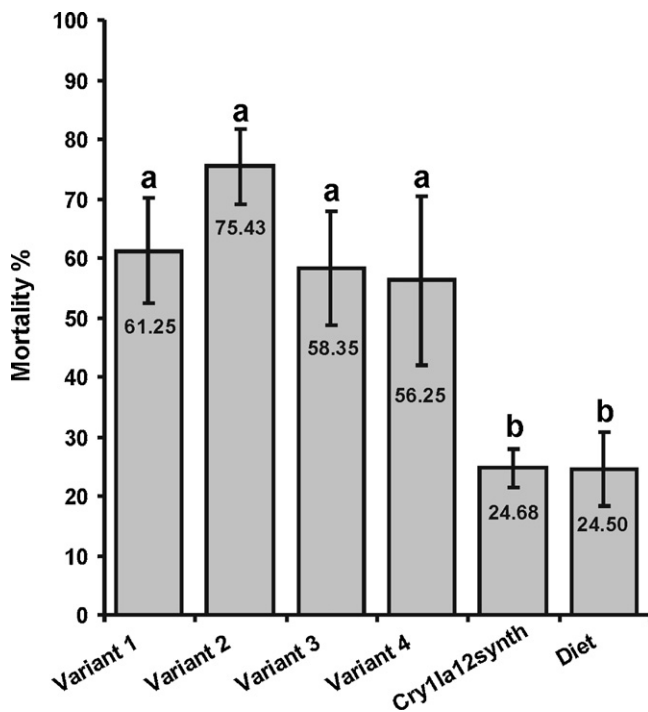
binatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The second and third rounds were chosen since they yielded phage showing the highest binding specificity to *T. l. licus* BBMVs (Fig. 2). Four hundred randomly chosen clones from the second and third rounds exhibited amplicons corresponding to the original gene size of 1944 bp (data not show). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the hemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *T. l. licus*.

### 3.3. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

Bioassays to test the activity of Cry11a12synth and the 30 selected Cry11a12synth variants against *T. l. licus* were conducted by feeding neonate larvae an artificial diet containing 10 µg/mL of the proteins expressed in fusion with M13 phage. Incubation of larvae either with a Cry11a12synth protein-supplemented diet or a diet with no supplementation (negative control) resulted in a mortality rate of about 25%, indicating that Cry11a12synth protein is not active against *T. l. licus* at the concentration tested (Fig. 3). On the other hand, four out of the thirty Cry11a12synth variants tested had a statistically significant effect on *T. l. licus* as compared to the non-supplemented diet (Fig. 3). The analysis of variance was significant for the mortality rates of these four variants ( $F=20.10$ ;  $p<0.0001$ ). Statistical analysis to compare the average mortality rate revealed that the variants had similar toxicity to each other and higher toxicity than Cry11a12synth (Fig. 3).

### 3.4. Analysis of the mutations in the active *Cry11a12synth* variants

The four Cry11a12synth variants previously demonstrated to be active against *T. l. licus* were sequenced, and after assembly and alignment analysis, these new variant sequences were deposited in the NCBI gene databank under assigned accession numbers FJ938023 to FJ938026, respectively corresponding to *cry11a12synth* variants 1–4. The *cry11a12synth* gene and its four shuffled variant genes encode proteins of 648 amino acid residues. Sequence alignments comparing parental *cry11a12synth* and its variants identified numerous nucleotide substitutions. Most of these nucleotide substitutions resulted in silent mutations, but a few resulted in amino acid residue substitutions (mutations). No deletions were obtained



**Fig. 3.** Bioassays of Cry11a12synth and variants against *T. l. licus*. Treatments consisted of artificial diet supplemented or without Cry11a12synth protein or its variants. Average mortality rates (%) are plotted (vertical bars) and corresponding values are indicated. The standard deviation is indicated for each treatment (vertical lines). Average mortality rate values with different letters differ from each other by the Tukey's test at a probability of 5%.

(Table 1). Most of the changes in amino acid sequence were found in domain I, with a few changes found in domain III and none in domain II (Table 1).

To try to predict the effects of the mutations on structure and function, theoretical models were built for Cry11a12synth and the four variants by using Cry8Ea1 and Cry3Bb1 (PDB entries 3EB7 and 1J16, respectively) (Galitsky et al., 2001; Guo et al., 2009) as templates. Models were chosen for Cry11a12synth and its variants according to PROCHECK analysis. In the template crystal structures chosen (i.e. E3B7 and 1J16) there are no defined atomic coordinates to serve as templates to model N- and C-termini of the Cry11a12synth variant structures. Therefore, the models of the Cry11a12synth variants correspond to residues 62–643 (residue numbers of the Cry primary sequences), lacking the N- and C-termini but containing the three conserved domains of the Cry toxin structure (Fig. 4A).

The theoretical tertiary structure of Cry11a12synth depicts the location of the eight substitutions present in variants 1–4 (Fig. 4A). Three substitutions are located in domain I (Fig. 4A): (i) I116T, in variant 3, located in the loop between alpha2b and alpha3; (ii)

D233N, in all variants except for variant 3, located in helix  $\alpha$ 6; and (iii) L266F, in variant 3, located in helix  $\alpha$ 7. Two mutations were found in domain III: (i) K580R, in variant 3, located in strand  $\beta$ 16; and (ii) E639G, in variant 1, located in strand  $\beta$ 19.

#### 4. Discussion

The gene *cry11a12*, previously isolated by our group from *B. thuringiensis* S811 strain, encodes a protein proven to be highly effective against the lepidopteran species *S. frugiperda*. In the present work, we generated a combinatorial phage-display library of variants of *cry11a12synth* via DNA shuffling and successfully identified four variants with optimised activity against *T. l. licus*.

In the last decade, directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling, have been employed in the agricultural research to create genes, such as the *cry* genes, encoding insecticidal molecules for the development of transgenic insect-resistant plants (Lassner and Bedbrook, 2001). The DNA shuffling strategy used here was highly efficient for our purposes, as it generated  $1.97 \times 10^5$  variants of *cry11a12synth*, out of which over 400 bound specifically to *T. l. licus* BBMV. Furthermore, four out of 30 tested variants presented activity against sugarcane giant borer neonate larvae when compared to the non-toxic Cry11a12synth.

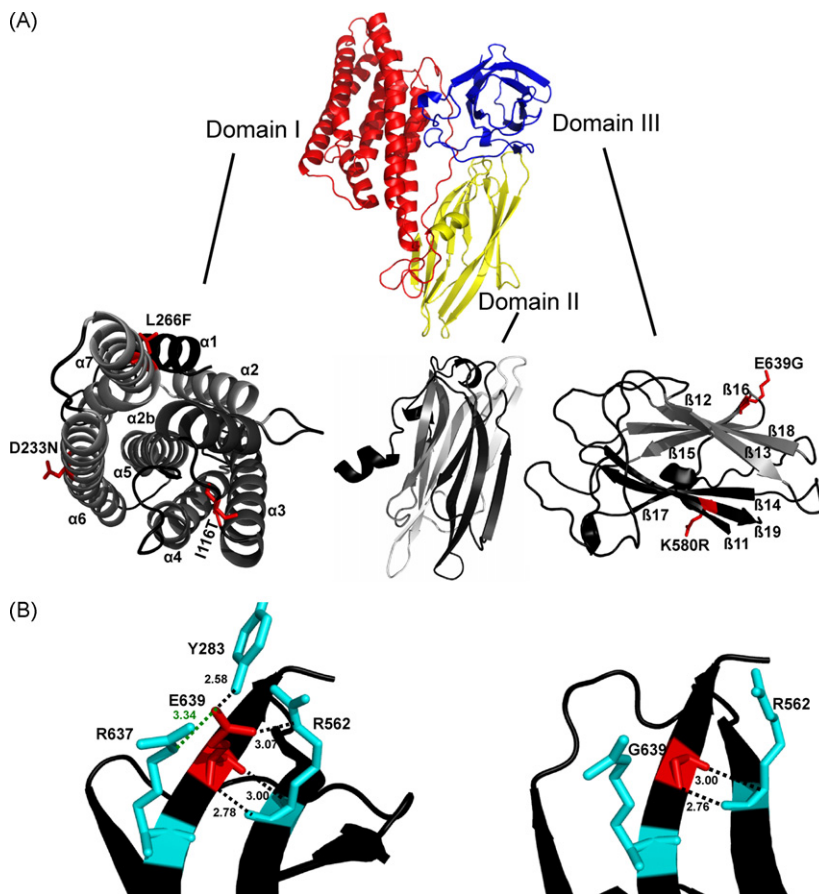
In comparison to conventional bacterial expression systems, the phage-display system, in addition to providing soluble, ready-to-use protein, has advantages for the selection of variants that include speed, ease of use and low cost. However, previous studies (Kasman et al., 1998; Marzari et al., 1997) have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. It was found that the Cry1Aa toxin was not properly displayed, resulting in deletions of the fused protein. Moreover, despite the fact that Cry1Ac toxin displayed by M13 phage retained its toxicity against *Manduca sexta* larvae, there was no binding to functional insect midgut receptors *in vitro*, suggesting structural restrictions of the displayed toxin (Pacheco et al., 2006). In spite of these limitations previously related in the literature, our group apparently established optimal conditions that overcame such constraints to successfully express Cry11a12synth protein variants with the M13 phage-display system.

When considering the four Cry11a12synth variants active against sugarcane giant borer larvae, eight mutation sites of amino acid substitutions were found. Out of these eight, half resulted in substitutions of nonpolar residues, whereas the other half resulted in substitution of charged residues. Moreover, it was observed that most of these mutations were found in domain I of the Cry11a12synth active variants. One of the roles of the Cry domain I is the insertion of the protein into the membrane. Dean et al. (1996) using Y153D, Y153A and Y153R substitutions in Cry1Ab domain I, demonstrated that the negatively charged residue D was less favourable for toxin insertion into membranes than the positively charged R or neutral A residues. Another biological role attributed to Cry domain I is the formation of pores. Girade et al. (2009) demonstrated with Cry1Aa mutations in the  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 5 helices and the  $\alpha$ 3– $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 5– $\alpha$ 6 adjacent loops that these regions have an important role in the pore formation mechanism. Therefore, mutations located in domain I of the Cry11a12synth variants may have influenced their insertion into the membrane or pore formation in the midgut of *T. l. licus*.

In our work, two mutations in active Cry11a12synth variants were found in domain III, a domain associated with protection of Cry from proteolysis, with receptor binding and with regulation of pore formation (Flores et al., 1997). In this respect, there is evidence that domain III of Cry proteins is involved in binding to membrane proteins of the *Spodoptera exigua* midgut, demonstrating that domain III of Cry1C can play an important role in toxicity to insect pests (de Maagd et al., 1996).

**Table 1**  
Mutations present in Cry11a12synth variants.

Variant	Substitution mutation	Domain
1	D233N	I
	E639G	III
2	D233N	I
3	I116T	I
	L266F	I
	K580R	III
4	M45V	N-terminus
	D233N	I



**Fig. 4.** Theoretical models of Cry1Ia12synth and variants. (A) A Cry1Ia12synth ribbon diagram, as viewed using PyMOL, is depicted at the top of panel A. Domain I is shown in red, domain II in yellow and domain III in blue. Separate models of each Cry1Ia12synth domain is shown in detail at the bottom of panel A.  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands are identified. Amino acid single substitutions present in the variants are coloured in red. The black dashed lines represent hydrogen bonds and the green dashed lines represent salt bridges. (B) Details of an amino acid substitution present in Cry1Ia12synth variant 1 (right), as compared to the parental Cry1Ia12synth (left). The variant 1 presents the mutation E639G, located in the  $\beta$ 19 strand in domain III. The model on the left depicts the interactions between residue E639 (in red) and residues Y283 (from block 2), R562 (from block 4) and R637 (from block 5) (in cyan). These interactions are disrupted in Cry1Ia12synth variant 1 (right).

Taken alongside previous data in the literature, our molecular modelling analysis provides potential explanations for the activity of the four variants:

- (i) In all Cry proteins, there are three conserved blocks, denoted blocks 2, 4 and 5, that are associated with the functionality of the toxins (Schnepf et al., 1998). In reference to the mutation E639G found in variant 1, G639 interacts solely with residue R562 from block 4 through two hydrogen bonds of around 3 Å, whereas in the Cry1Ia12synth protein, E639 interacts with Y283 from block 2 through a hydrogen bond of 2.58 Å, with R562 from block 4 through three hydrogen bonds of around 3 Å, and with R637 from block 5 through a salt bridge of 3.34 Å (Fig. 4B). Moreover, the mutation E639G of variant 1 is located in the  $\beta$ 19 strand of domain III, a domain associated with protection of the toxin from proteolysis, binding to midgut receptors, regulation of pore formation (Flores et al., 1997) and binding to insect midgut membrane proteins (de Maagd et al., 1996).
- (ii) Variant 2 contains the single mutation D233N. The residue at this position, be it D233 or N233, invariably presents its side chain to the solvent environment. These residues neither interact with nor belong to any region known to be relevant to the entomotoxic activity of Cry proteins. Nevertheless, the substitution of an oxygen from D233 for a nitrogen in N233 makes this spot on the toxin less negative, which might affect the

interactions of the toxin with the solvent environment. To elucidate the role of this mutation in the functionality of variant 2, it would be interesting to perform modelling studies of molecular dynamics in order to better understand the movement of the side chain of residue 233 in relation to simulated changes in environmental conditions. Modelling studies of Cry1Ia12synth or variant 2 docking to the Cry receptor might also be revealing. Moreover, bench experiments involving site-directed mutagenesis of residue 233 and its consequences on interactions with the receptor and protein toxicity could shed light on the role of this residue in Cry functionality.

- (iii) Three mutations occurring in variant 3 seem to present an interactive effect on the variant's structure, and consequently probably also on the variant's biological activity. Concerning the mutation I116T, the oxygen of T116 interacts with the beta-carbon of residue A120. This residue corresponds to residue A92 from Cry1Ab, which is involved in the insertion of the Cry toxin into the insect midgut membrane (Chen et al., 1995). Regarding the mutation L266F, L266 has its side chain turned towards the residues E455 (domain II), D270 and R262 (domain I). Thus the aromatic ring of F266, which is a less reactive residue than L266, interferes with interactions between domains I and II. With respect to the mutation K580R, both K580 and R580 are turned towards the neighbouring N578, which corresponds to the Cry1Ac N546 residue demonstrated to be related to Cry1Ac toxicity (Xiang et al., 2009).

Since the first 61 residues corresponding to the N-terminal portion of Cry1Ia12synth were not modelled, the effect of the mutation M45V present in variant 4 could neither be modelled nor analysed.

This work presents a pioneering approach towards the generation and selection of new genes to be used in the development of transgenic sugarcane resistant to the giant borer *T. l. licus*, a pest that is extremely resistant to conventional control methods and for which there is no known natural source of resistance. It should be noted that additional experiments, such as site-directed mutagenesis and modelling studies of molecular dynamics and interactions with the receptor are needed to better understand the effects of the mutations present in the Cry1Ia12synth variants on the biological activity of these proteins against *T. l. licus*. It will be also interesting to test these toxins against to others insect pest and non-target beneficial insects. In conclusion, the Cry1Ia12synth variants 1 to 4 are active against sugarcane giant borer larvae and are therefore promising proteins for the future development of transgenic sugarcane resistant to insect pests.

### Acknowledgments

The present work was performed with financial support from CNPq, CAPES and EMBRAPA. The authors thank: Dr. Andréa Maranhão (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage-display approaches; Dr. Dan Rigden (University of Liverpool, UK) for critical reading; Mr. Luiz Avelar Brandão Góis (Phytosanity Supervisor, Usina Triunfo, AL, Brazil) for sending us the giant borer larvae and Dr. Eduardo Alano Vieira (EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF, Brazil) for the aid in statistical analyses.

### References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., Barbas III, C.F., 2000. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. *J. Immunol. Methods* 242, 159–181.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, D.H., 1995. Mutations in Domain I of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270, 6412–6419.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M., Barton, G.F., 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20, 426–427.
- Cruz, C.D., 2001. Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa.
- de Maagd, R.A., Kwa, M.S.G., Klei, V.D., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlask, J.M., Stiekema, W.J., Bosch, D., 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537–1543.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.-J., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R., 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview. *Gene* 179, 111–117.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., Bravo, A., 1997. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* 414, 313–318.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr., Sect. D.* 57, 1101–1109.
- Girade, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Scgwartz, J.-L., Masson, L., Laprade, R., 2009. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 575–580.
- Grossi-de-Sa, M.F., Magalhães, M.Q., Silva, M.S., Silva, S.M.B., Dias, S.C., Nakasu, E.Y.T., Brunetta, P.S.F., Oliveira, G.R., Oliveira-Neto, O.B., Oliveira, R.S., Soares, L.H.B., Ayub, M.A.Z., Siqueira, H.A.A., Figueira, E.L.Z., 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 773–782.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D., Rao, Z., 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168, 259–266.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242–255.
- Kasman, L.M., Lukowiak, A.A., Garczynski, S.F., McNall, R.J., Youngman, P., Adang, M.J., 1998. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2995–3003.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Lassner, M., Bedbrook, J., 2001. Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 152–156.
- Marzari, R., Edomi, P., Bhatnagar, R.K., Ahmad, S., Selvapandian, A., Bradbury, A., 1997. Phage display of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Lett.* 411, 27–31.
- Mendonça, A.F., 1982. A broca gigante *Castnia licus* Drury, 1770 (Lepidoptera: Castniidae) no Brasil. *Saccharum APC*, São Paulo.
- Mendonça, A.F., Viveiros, A.J.A., Sampaio, F.F., 1996. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). *Pragas da cana-de-açúcar. Insetos, Cia., Maceió*, pp. 133–167.
- Pacheco, S., Gómez, I., Sato, R., Bravo, A., Soberón, M., 2006. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 45–49.
- Patten, P.A., Howard, R.J., Stemmer, W.P.C., 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724–733.
- Rader, C., Steinberger, P., Barbas III, C.F., 2001. Selection from Antibody Libraries. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 10.1–10.20.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Releclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Scott, J.K., Barbas III, C.F., 2001. Phage-display Vectors. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 2.1–2.19.
- Silva-Werneck, J.O., Ellar, D.J., 2008. Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 320–328.
- Staden, R., 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 233–241.
- Stemmer, W.P.C., 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Lett. Nat.* 370, 389–391.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Willats, W.G.T., 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 50, 837–854.
- Wolffersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 301–308.
- Xiang, W.F., Qiu, X.L., Zhi, D.X., Min, Z.X., 2009. N546 in  $\beta$ 18- $\beta$ 19 loop is important for binding and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 119–123.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla Jr., L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenyllyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9897–9902.
- Zhao, H., Arnold, F.H., 1997. Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* 25, 1307–1308.

## **Anexo 3**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*)

Gustavo R Oliveira<sup>3,7</sup>, Maria CM Silva<sup>3</sup>, Wagner A Lucena<sup>2,3,5</sup>, Erich YT Nakasu<sup>3</sup>, Alexandre AP Firmino<sup>3,5</sup>, Magda A Beneventi<sup>3</sup>, Djair SL Souza<sup>1</sup>, José E Gomes Jr<sup>1,3</sup>, José DA de Souza Jr<sup>1,3</sup>, Daniel J Rigden<sup>4</sup>, Hudson B Ramos<sup>1</sup>, Carlos R Soccol<sup>7</sup> and Maria F Grossi-de-Sa<sup>3,5,6\*</sup>

## Abstract

**Background:** The cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) is a serious insect-pest in the Americas, particularly in Brazil. The use of chemical or biological insect control is not effective against the cotton boll weevil because of its endophytic life style. Therefore, the use of biotechnological tools to produce insect-resistant transgenic plants represents an important strategy to reduce the damage to cotton plants caused by the boll weevil. The present study focuses on the identification of novel molecules that show improved toxicity against the cotton boll weevil. *In vitro* directed molecular evolution through DNA shuffling and phage display screening was applied to enhance the insecticidal activity of variants of the Cry8Ka1 protein of *Bacillus thuringiensis*.

**Results:** Bioassays carried out with *A. grandis* larvae revealed that the LC<sub>50</sub> of the screened mutant Cry8Ka5 toxin was 3.15-fold higher than the wild-type Cry8Ka1 toxin. Homology modelling of Cry8Ka1 and the Cry8Ka5 mutant suggested that both proteins retained the typical three-domain Cry family structure. The mutated residues were located mostly in loops and appeared unlikely to interfere with molecular stability.

**Conclusions:** The improved toxicity of the Cry8Ka5 mutant obtained in this study will allow the generation of a transgenic cotton event with improved potential to control *A. grandis*.

**Keywords:** *Anthonomus grandis*, *Bacillus thuringiensis*, Cotton, DNA shuffling, Phage display, Molecular modeling

## Background

*Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), commonly known as the cotton boll weevil, is the most harmful cotton-feeding insect-pest in the Americas [1-4]. Even in cotton fields where the insect has been considered eradicated (e.g. Mississippi State USA), the growers must maintain a continued vigil because of the tremendous ability of the boll weevil to return to previous controlled regions from time to time to re-infest. Millions of dollars in insecticides were spent by growers to have areas eradicated. In not eradicated areas, yield losses to boll weevil exceeded until 10 percent in certain years and the growers had to apply 8-12 boll weevil sprays per field [5]. These repeated treatments are necessary, because only adult boll weevils feed on tender

cotton terminals, on pollen from flower buds and on fruits. The larvae are protected inside the boll, which makes difficult the contact with chemical pesticides. Recently presented during forum Brazil' 2010/11, cotton area production is estimated at 1.2 million of hectares the highest since the early 1990's [6]. However, especially in Brazil, boll weevil is considered a key pest in cotton fields and despite of pest management and several insecticide sprays, an efficient boll weevil control does not exist. As an alternative to chemicals, the use of transgenic plants resistant to *A. grandis* presents a potential solution to the problem posed by insect-pests [7]. The development of genetically modified (GM) crops expressing Cry toxins has been widely researched due to the toxic effect of these molecules against insect-pests (lepidopterans, coleopterans and dipterans) and nematodes which attack and thereby affect the productivity of crops such as cotton [8]. These toxins are harmless to vertebrates and plants due their high

\* Correspondence: fatimasa@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5 Norte -Brasília, DF, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article



specificity to the insect target. Since 1996, several insect-resistant GM cotton events have been used commercially throughout the world, including Bollgard<sup>®</sup> (expressing the *cry1Ac* protein) and Bollgard II<sup>®</sup> (expressing the *cry1Ac* + *cry2Ab* proteins) from Monsanto, Widestrike<sup>®</sup> (expressing the *cry1Ac* + *cry1F* proteins) from Dow Agrosciences and VipCot<sup>®</sup> (expressing *Vip3A* protein) from Syngenta/Deltapines. This technology has been used to control lepidopterans, allowing an increase in productivity, reductions in production costs, human intoxication and environmental damage due to a reduction in chemical pesticide application [9]. At the moment, however, none of the commercially available GM cotton events are effective against the cotton boll weevil, which is the most harmful cotton insect-pest in Latin America. Cry proteins are included in parasporal crystalline structures produced by *Bacillus thuringiensis* during sporulation [10,11]. Several hypothesis about the insecticidal mechanism of action of Cry toxins have been discussed in previous studies [12,13], including the pore formation model [8,13,14] and the signal transduction model [15]. More recently, Guo et al [16] proposed a plausible model for the initiation of Cry toxin domain disassembly before membrane penetration and pore formation. After ingestion, the crystals are solubilised and activated by insect midgut proteases. According to Bravo and Soberon [8], the binding of toxins to specific cadherin-like receptors triggers the oligomerization of toxin monomers. Directed by an aminopeptidase-N receptor, the oligomer is inserted into the cell membrane and forms a pore. Those pores are responsible for a net influx of ions and water, leading to disturbances in osmotic balance, cell lysis, midgut damage and insect death [8]. In the intracellular signalling model [15], the binding of toxins to the cadherin-like receptor triggers an Mg<sup>2+</sup>-dependent cAMP signalling pathway that promotes cell death. In both models, the affinity for cadherin receptors has been reported as the main step that determines specificity. Mutations in those receptors have been reported to be the cause of resistance acquisition [8]. Moreover, Broderick et al [17] suggested that the cry toxin activity is also dependent on the microorganisms of the insect midgut. Molecular strategies that involve structural and biochemical studies of Cry toxins, as well as the isolation and characterisation of new *cry* genes, are necessary to help elucidate the mechanisms of action of Cry toxins and also to select molecules that have the potential for improved toxicity and specificity [14].

In this context, DNA shuffling, as described by Stemmer [18] and following modifications reported by Zhao and Arnold [19], is the most commonly used technique to promote *in vitro* directed molecular evolution. In this technique, the introduction of random mutations into

the nucleotide sequences results in a pool of mutants from which proteins with improved function can be selected. Considering the biotechnological context, this technique has been used as a tool to generate libraries that contain variant genes encoding engineered proteins, which can subsequently be selected according to their potential agricultural or pharmaceutical use [20,21]. In a previous study reported by our group, a recombinant toxin produced by the *cryIIa12* gene exhibited moderate toxicity towards first instar larvae from both the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (50% mortality with 5 µg.mL<sup>-1</sup>) and the coleopteran cotton boll weevil (50% mortality with 230 µg. mL<sup>-1</sup>) [22]. More recently, *cryIIa12synth* (a *cryIIa12* synthetic gene containing plant codon usage) was used in an approach applying DNA shuffling coupled with the phage display technique, which involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for the facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target [23]. Our data showed that this strategy was able to efficiently generate genetic diversity, and the screening of the combinatorial library for *cryIIa12synth* variants resulted in the identification of novel molecules with improved entomotoxicity towards the sugarcane giant borer larvae, *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae), an activity not exhibited by the wild-type protein encoded by the original *cryIIa12* gene [24].

In a parallel manner, our team isolated a new gene classified as *cry8Ka1* (GenBank accession no. FJ422558) from a Bt strain that showed moderate toxicity to the cotton boll weevil [25]. The entomotoxicity of recombinant Cry8Ka1 protein expressed in *E. coli* bioassayed against *A. grandis* larvae was confirmed [25,4].

In the present study, the *cry8Ka1* gene was used in the combined DNA shuffling and phage display techniques to create novel Cry mutant toxins with improved activity towards the coleopteran *A. grandis*. Around 10<sup>5</sup> Cry8Ka1 variants were generated, and the combinatorial library and screened phage selection allowed the isolation of new Cry toxins that exhibit improved toxicity against the boll weevil insect-pest. Among the screened Cry variants, Cry8Ka5 was selected for its high toxicity and potential use as a biotechnology tool for the generation of transgenic cotton plants. Analyses from theoretical models created for Cry8Ka1 and Cry8Ka5 toxin and comparison with other Cry toxin structures revealed that essential structural features are conserved.

## 2. Methods

### 2.1 Preparation of *A. grandis* Brush Border Membrane Vesicles (BBMVs)

Neonate *A. grandis* larvae were obtained from colonies grown at the Embrapa Genetic Resources and

Biotechnology Centre (Brasilia, Brazil) using an artificial diet [25]. The BBMV s were prepared from midguts of boll weevil larvae by Mg/EGTA precipitation and differential centrifugation [26]. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Two hundred midguts were centrifuged at 2500 × *g* for 5 min at 4°C, and the pellet was washed twice with MET buffer. The concentration of BBMV s proteins was determined by the Bradford assay [27] using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve. The aliquots were stored to -80°C until use.

## 2.2 cry8Ka1 gene amplification

A *cry8Ka1* gene was previously isolated by our team from a collection of *Bacillus thuringiensis* at the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology [25] was chosen for further studies because the encoded toxin had the potential to control the cotton boll weevil (*A. grandis*). First, the *cry8Ka1* gene (2001 bp), corresponding only to the active part of the toxin, was PCR-amplified from the original plasmid using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and the Cry8Ka1sfiF (5'CCCGGCCAGGCGGCCGACCACGCGTATCGA 3') and Cry8Ka1sfiR (5'CCCGGCCGCGCTGGCCGTTCAAGGAACCGTT 3') primers, which introduced an *Sfi* I restriction site (underlined). The PCR program included the following steps: a denaturation step, consisting of 1 cycle at 95°C for 5 min; 29 cycles consisting of a denaturation step of 40 s at 95°C; a hybridisation step of 40 s at 45°C; an elongation step of 40 s at 72°C; and finally, a step consisting of 2 min at 72°C. The PCR amplification product was analysed by 1% agarose (w/v) gel electrophoresis, and the DNA (approximately 2000 bp) was excised and gel-purified using the GeneClean® II Kit (BIO 101).

## 2.3 Generation of a combinatorial library using DNA shuffling and phage display

The *Sfi* I-digested, PCR-amplified *cry8Ka1* gene was used as the starting material for the DNA-shuffling procedure [18,19]. First, 10 µg of the purified *cry8Ka1* gene was randomly digested in a mixture containing 70 U of DNase I enzyme (Invitrogen) in DNase I buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.6, containing 1 mM MnCl<sub>2</sub> and 0.1 mg/mL BSA). The digestion reaction was performed at 15°C for 20 min and interrupted by the addition of 5 µL of 0.5 M EDTA. The digestion product was analysed by 2.5% agarose (w/v) gel electrophoresis and the 30-50-bp fragments were jointly purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE). Ten microliters of purified product were obtained by performing a PCR without primers in a 25-µL final volume containing 2.5

µM of each dNTP, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and 2.5 U of Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) in the supplied 1X buffer. A PCR program consisting of the following steps was used: 95°C for 2 min; 43 cycles of 95°C for 1 min; 44°C for 1 min and 72°C for 1 min (with a 5-s increase in extension time per cycle); and 7 min at 72°C. To reassemble the variant genes, the product of the primer-less PCR (7.6 µL) was used as template for a second PCR using the Cry8Ka1SfiF and Cry8Ka1SfiR primers. The PCR mixture had a final volume of 500 µL and contained 0.2 mM of each dNTP, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 800 nM of each primer and 25 U of *Taq* (Phonotria)/Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) (1:1 mixture) in the supplied 1X Platinum *Taq* buffer. The conditions for the second PCR were as follows: 2 min at 95°C; 10 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 45°C and 1 min at 72°C; 14 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 43°C and 42 s at 72°C (with a 20-s increase per cycle); and finally, 7 min at 72°C. All assembly reactions were performed in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf). The amplified shuffled product of approximately 2000 bp was analysed on a 1% agarose (w/v) gel, the single band of approximately 2000 bp was excised and the DNA was gel-purified using the GeneClean® II Kit (BIO 101). This product was digested using the *Sfi* I enzyme, and the variant genes (0.9 µg) were ligated into the pComb3X phagemid (3.6 µg) [28], which was also linearised using the *Sfi* I site. For a single reaction, T4 DNA ligase (Invitrogen) (12 U) and 5X ligase buffer were mixed to obtain a 200µL final volume. The ligation product was dialysed, lyophilised and dissolved in 15 µL of water and subsequently fractionated into five aliquots. Each aliquot (3 µL) was used to transform 60 µL of the electrocompetent XL1-Blue® strain of *Escherichia coli* (Stratagene), and the following procedures were carried out as first described by Barbas III et al. [29] using the same modifications that were previously reported in [24].

## 2.4 Selection of the Cry8Ka1 toxin variants that bind to A. grandis BBMV s (biopanning)

The biopanning procedure for screening the combinatorial library and selecting specific *cry8Ka1* toxin variants fused to phage particles was performed as described by Barbas III et al. [29] with modifications recently reported by Craveiro et al. [24]. At each round, wells in microtitre plate were coated with BBMV preparation (100 µg) and incubated 16 h at 4°C. After five rounds of selection, the clones from the cycle that exhibited the highest number of colony-forming units (cfus) were isolated and analysed to verify the integrity of the inserted *cry8ka1* variant genes via colony PCR using the Cry8Ka1sfiF and Cry8Ka1sfiR primers (described above). The clones that presented amplicons

around 2000 bp in length were further used for the expression of Cry8Ka1 variant proteins.

### 2.5 Expression of Cry8Ka (parental and variant gene toxins) in fusion phage particles

First, the parental *cry8Ka1* gene and several variants exhibiting size integrity (approximately 2000 bp) were expressed on the surface of M13 phage and analysed by immunodetection (Dot blot) exactly as reported in a previous study using the *cry11a12* gene and variants by Craveiro et al. [24].

### 2.6 Subcloning of cry8Ka1 and selected variant genes into vectors for expression in E. coli bacteria

To confirm that toxins expressed by phage fusion exhibited correct folding and activity, *cry8Ka1* and *cry8Ka5* variant genes were subcloned into the pET101/D TOPO (Invitrogen) plasmid according to the manufacturer's instructions. The CRY8PETF (5' CACCATGCGA-CACCTTCTACATCTG 3') and CRY8PETR (5' CTAA-GAAGCGTAGTCCGGAAC 3') primers were used to insert recombinant sites into genes. The pET101-based expression constructions, Cry8Ka1PET101 and Cry8Ka5PET01, were used to transform *E. coli* cells of the BL21 (DE3) strain according to the manufacturer's instructions. One colony of the bacteria carrying each construct was cultivated at 37°C in 5 mL of Luria Bertani (LB) medium containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) (i.e., LB selective medium), under vigorous agitation (200 rpm) until an OD<sub>600nm</sub> of 0.6 was reached. This pre-inoculum suspension was used to inoculate 2 L of fresh LB selective medium, which was agitated for 6 h after induction by the addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM. Before induction, an aliquot of the culture cells was collected and reserved. Typically, cells were harvested by centrifugation (3000 × g, 10 min), and the pellet was resuspended using 1 mL of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer. Thereafter, the cell suspension was lysed by sonication and stored at -80°C until use. Final purification of His6X-tagged mature Cry8Ka1 and variant toxins was performed using affinity chromatography on 5 mL batches of Ni-NTA (QIAGEN) solid phase. The column equilibrium and chromatography conditions were performed according to the manufacturer's instructions. The eluted fractions were collected, dialysed against water and then lyophilised.

### 2.7 Western blotting analysis

The purified recombinant proteins were analysed using SDS-PAGE [30]. Typically, a 12% gel was loaded with 5 µg of each expressed protein (Cry8Ka1 and its selected mutants). After electrophoresis, the proteins in the gel were visualised by Coomassie Blue R-250 staining. For Western blotting, the protein samples were transferred

onto a HYBOND™-C EXTRA nitrocellulose membrane using a Trans-blot Semi-dry Transfer Cell (BioRad®). The solution used to block the membrane consisted of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in TBS (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5). Thereafter, the membrane was incubated with anti-His-AP conjugate (Invitrogen®) (1:2000 dilution in TBS) for 2 h at room temperature. After the membrane was washed three times using TBS-T (0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma®) added to TBS), the immune reactive bands were detected by immersing the blot according to the manufacturer's instructions using an alkaline phosphatase conjugate substrate® kit (BioRad®).

### 2.8 Quantification of the expressed toxins (ELISA)

To quantify proteins expressed by *E. coli* (as described in 2.6), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed using the polyclonal rabbit anti-Cry8Ka1 antibody, which was previously produced and purified by our team (not shown). The concentration of purified proteins was first determined according to Bradford method [27]. For a standard curve, a serial dilution was performed using purified Cry8Ka1 toxin (4 ng to 0.0019 ng) in wells of a microtiter plate. The wells of the plate were protein immobilised for 24 h at 4°C and then blocked using a solution containing 3% (w/v) BSA in TBS-T buffer for 4 h at room temperature. Following the washes, the polyclonal anti-Cry8Ka1 antibody (diluted 1:10000 in TBS-T containing 1% BSA) was deposited and incubated for 16 h at 4°C. After washes, samples were incubated with anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to peroxidase (Bio-Rad) (diluted 1:1000) for 2 h at room temperature. The TMB Peroxidase EIA Substrate Kit® (BioRad) was used for detection according to the manufacturer's instructions, and the reaction was stopped with 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was measured at 405 nm using Benchmark Plus (BioRad). The assays were carried out in triplicate.

### 2.9 Bioassays of Cry8Ka1 and variants using A. grandis larvae

To assess the toxicity of Cry8Ka1 and its variants against neonate *A. grandis* larvae the bioassays were performed in two different situations. In the first bioassays for fast screening of variants indicating toxicity, fusion phage-expressed Cry8ka1 and variants were utilized in artificial diet (10<sup>11</sup> pfu mL<sup>-1</sup> of phage-expressed). Later bioassays were repeated using expressed in bacteria and purified Cry8ka1 and variants (0, 3, 6, 9 and 12 µg/mL) showing significant toxicity in preliminary screening. In both, bioassays were carried out in six-well cell culture plates filled with artificial diet [18% (w/v) Agar, 2.72% (w/v) Brewer's yeast, 4.48% (w/v) Soybean protein, 2.72% (w/v) Wheat germ, 18% (w/v) Pharmamedia®,

0.1% (w/v) Sorbic Acid, 0.9% (w/v) Ascorbic Acid, 2.72% (w/v) Glucose, 0.9% (w/v) Nipagin, 0.05% (w/v) Mineral salts, 0.45% (w/v) vitamin mixture] and phage-expressed (first bioassay) or Cry8Ka1 or variants (detected in dot blot analyses, data not shown)(second bioassay). Twelve larvae were placed in each well and the plate was incubated for seven days at 27°C ( $\pm 1$ ) with 80% relative humidity and a 14-h photoperiod. An artificial diet containing no additional Cry proteins was used as the negative control. Each treatment was carried out in triplicate and the bioassay was repeated to until six different dates. After seven days, the number of surviving larvae was recorded for each treatment. Statistical analyses were performed to compare the average percent mortalities by ANOVA and Tukey's means comparison analysis using the SigmaStat<sup>®</sup> software vs. 3.1 (Systat Inc., San Jose, California, 2004). The LC50 (lethal concentration required to kill 50% of insects) obtained from bioassays performed using bacteria-expressed proteins was calculated by Probit analysis [31] using the Polo-Pc software (LeOra Software).

### 2.10 DNA sequence analysis

The nucleotide sequences of the *cry8Ka1* variant genes encoding toxins active against *A. grandis* larvae (according to bioassay analyses) were determined using a 3130xL Genetic Analyser (Applied Biosystems). To obtain the complete nucleotide sequences, several primers were used. 1) Primers designed to determine the N-terminal and C-terminal sequences were as follows: PCOMBF (5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3') and PCOMBR (5'-CGTTTGCCATCTTTTCATAAT-3'). 2) Primers designed to obtain the intermediate sequences were as follows: Cry8INTERF (5'-CATATG CACAAGCTGCGAATT-3'), Cry8INTERR (5'-GCTTC CGGCTCGTATGTTGTGT-3'), Cry8ka5INTERF (5'-AGCGGATTTGGGCAATTCAG-3') and Cry8ka5INTERR (5'-TAACAGCTGGAATTTGAGGA-3'). The sequences were analysed using the BLASTn and BLASTp algorithms [32], which are available on the NCBI homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. In order to assemble the sequenced fragments and to identify the position of the mutated residues, multiple sequence alignment programs were used, including the STADEN PACKAGE (available at <http://staden.sourceforge.net/>) [33] and CLUSTALW (available at <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) [34].

### 2.11 Molecular analysis and homology modelling

Proteins showing homology to Cry8Ka1 were found in the nr database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST with default parameters [32]. The resulting sequence set was aligned using Muscle [35]. Suitable templates for Cry8Ka1 model

building were found using a FASTA search of sequences in the Protein Data Bank [36] at the European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>.

After manual refinement of the sequence alignment, homology models of Cry8Ka1 (667 amino acid residues) and mutant Cry8Ka5 (649 amino acid residues) were created using MODELLER, Version 9.8 [37]. The Cry8Ea1 [16] (PDB entry 3EB7) toxin structures was used as template for construction of the structural model. In the final alignment, Cry8Ka1 shared 34.7% sequence identity with the template. Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. Because of the low sequence similarity between target and template, a rigorous iterative modelling protocol was adopted in which 50 models were constructed and analysed. These models were analysed for packing and for stereochemical properties using PROCHECK [38]. Possible misalignments were highlighted by DOPE (Discrete Optimised Protein Energy; a statical potential used to assess homology models, running within the MODELLER environment) peaks, and variations in alignment of these regions were examined. When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK and DOPE scores was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated using PyMOL 1.3 [39] (available at <http://www.pymol.org/>).

## 3. Results

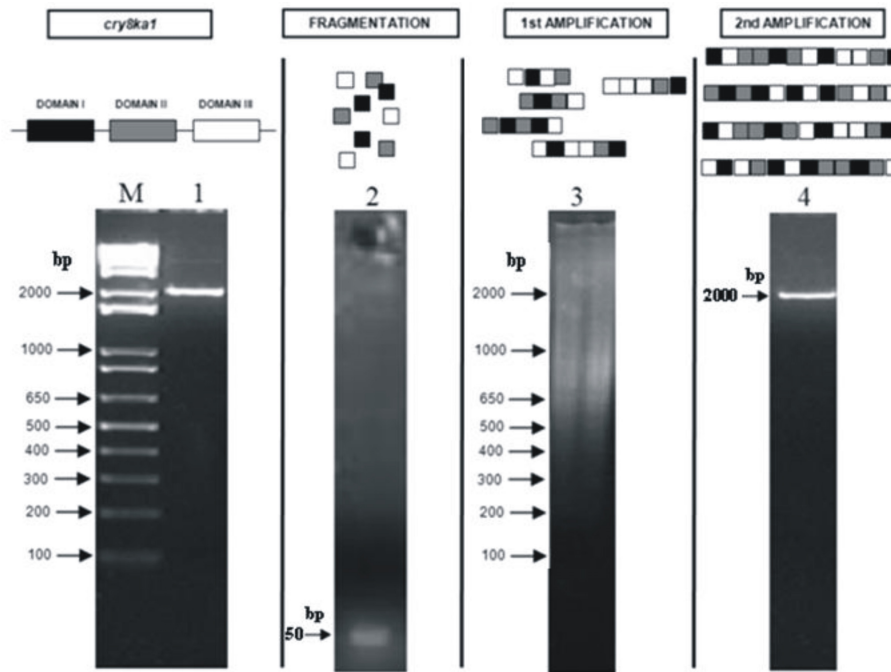
### 3.1 DNA shuffling and combinatorial library construction

To generate variants by applying the DNA shuffling procedure, the *cry8Ka1* nucleotide sequence (2001 bp) was PCR-amplified from the original vector and fragmented using DNase I. The resulting fragments in the 30-50 bp range were jointly purified and recombined to form reassembled genes using two consecutive PCR progressive programs. Using agarose gel electrophoresis, the DNA shuffling product was visualised as a single band of around 2000 bp that represented a population of *cry8Ka1* variant genes (Figure 1).

Both the DNA that contained the population of gene variants (DNA shuffling products) and also the PCR-amplified *cry8Ka1* gene were excised from gel, purified and then cloned into the pCOMB3X phagemid, resulting in pCOMB*cry8Ka1* and pCOMB*cry8Ka1*var constructs. The pCOMB*cry8Ka1*var construct was used to generate a combinatorial phage-display library of *cry8Ka1* variants containing  $1.0 \times 10^5$  cfu/mL.

### 3.2 Screening of *cry8Ka1* combinatorial library towards BBMVs *A. grandis*

To select the clones expressing Cry8ka1 variants that bind specifically to the *A. grandis* midgut, the phage-



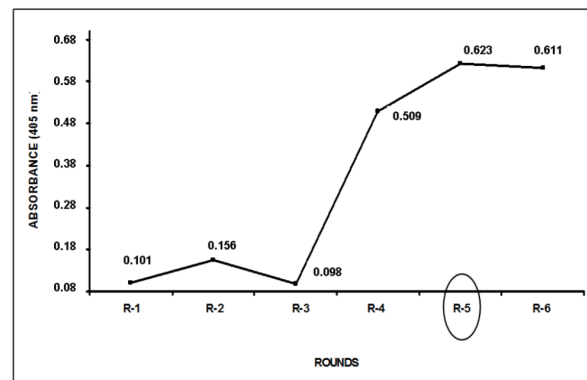
**Figure 1 Illustration of the DNA shuffling steps.** The DNA shuffling product was analyzed on 2.5% agarose gel electrophoresis. **Lane M:** 1Kb-plus ladder (Invitrogen); **lane 1:** *cry8Ka1* gene amplification containing only the region correspondent to mature toxin (Domains 1, II and III - 2001 bp); **lane 2:** DNase I digestion product resulting to fragments of 50 bp; **lane 3:** Reassembled PCR product using as template fragments containing 50 bp (obtained jointly and gel purified) and no primers added to reaction; **lane 4:** PCR amplification containing pool of variants (around 2000 bp) to reassembled genes.

display combinatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The fifth round was chosen because it yielded phage showing the highest binding specificity to *A. grandis* BBMVs (Figure 2). Two hundred randomly chosen clones from the fifth round exhibited amplicons corresponding to the original gene size of around 2000 bp (data not shown). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the haemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *A. grandis*.

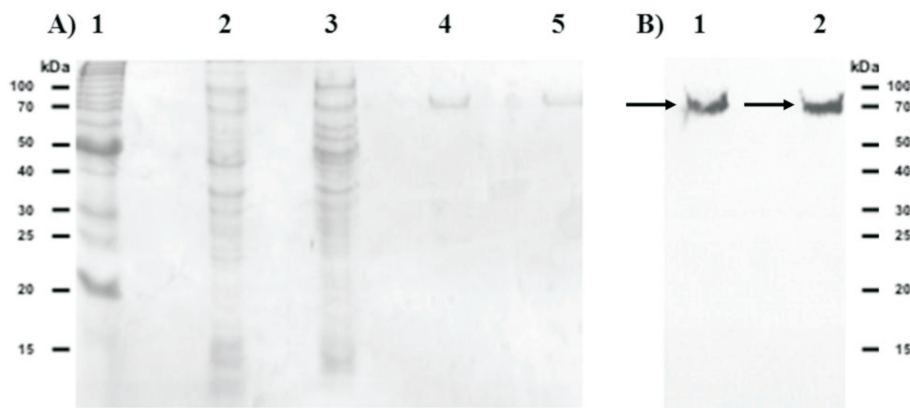
### 3.3. Evaluation of toxicity of the Cry variants in bioassays

To assess the  $LC_{50}$ , neonate *A. grandis* larvae were incubated with purified Cry8Ka1 and Cry8Ka5 toxins expressed by the *E. coli* BL21 (DE3) strain (Figure 3).

Bioassays were conducted to evaluate the activity of Cry8Ka1 variants compared to the wild-type Cry8Ka1 toxin when incubated with neonate *A. grandis* larvae. The larvae mortality rate (Table 1) indicated no significant difference between treatment with a diet



**Figure 2 Biopanning screening of the *cry8ka1* Phage display combinatorial library for interactions of Cry8Ka1 variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) from cotton boll weevil larvae (*A. grandis*).** The absorbance indicated in the graph shows the phage-infected, which was related to the quantity of bacterial colonies obtained from each round of biopanning. Based in the data, the fifth round of biopanning was chosen as cycle of the enrichment of recombinant phages displaying Cry8Ka1 variants specifically bound to *A. grandis* BBMVs. The points of the curve indicate the absorbance at 405 nm (reading of phage) in each round.



**Figure 3** SDS-PAGE electrophoresis and Western blot analysis of Cry8Ka1 and Cry8Ka5 expressed in *E. coli* cells. The original and variant recombinant Cry8K toxins were fractionated by SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane and probed with monoclonal Anti-His<sup>®</sup> antibody **A)** Lane 1, BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); lane 2, proteins from non-induced cells (supernatant); lane 3, proteins expressed after induction with 0.5 mM IPTG-(supernatant); lane 4 and 5, Cry8Ka5 and Cry8Ka1 recombinant toxins, respectively, purified by using affinity chromatography as described in material and methods. **B)** Western immunoblot analysis. Lane 1 and 2 the arrows indicate Cry8Ka5 and Cry8Ka1 recombinant toxins, both with approximate molecular weights of 70 kDa.

supplemented with Cry8Ka1 protein, a diet supplemented with M13 helper phage or a diet with no protein supplementation (negative control) at the concentration tested. On the other hand, two (Cry8Ka3 and Cry8Ka5) out of the thirty Cry8Ka1 variants tested had a statistically significant effect on *A. grandis* compared to controls. The analysis of variance was significant for the mortality rates of these two variants. Based on these results, the Cry8Ka5 toxin was selected for additional characterisation (Figure 4A). The LC<sub>50</sub> for the recombinant Cry8Ka5 protein was significantly lower (2.83 µg/mL) than that of Cry8Ka1 (8.93 µg/mL) (Figure 4B and 4C), indicating improved toxicity (three times higher) for the

novel toxin (Cry8Ka5) selected from the combinatorial library of Cry8Ka1 variants (Figure 4C).

### 3.4 Structural analysis of Cry8Ka1 variant toxins

Firstly, the presence of genetic variability in the *cry8Ka1* combinatorial library was determined using nucleotide sequence analysis (data not shown) of 30 clones isolated from the pool of variants that was obtained at the fifth round of biopanning, which was chosen as the cycle containing the highest enrichment of specific phage.

The selected *cry8Ka5* gene (1947 bp) encoded a protein of 649 amino acid residues. Sequence comparisons among the parental *cry8Ka1* gene (2001 bp) and the variant genes identified numerous nucleotide substitutions (Figure 5). However, most of these nucleotide substitutions were silent mutations. *In silico* amino acid sequence translation revealed just six changed residues that were located in positions distributed throughout the three typical domains of Cry toxins, using the Cry8Ka1 and Cry8Ka5 comparison as indicated (Figure 6). One substitution was observed in domain I (R82Q; within the α3 helix), two substitutions (Y260C and P321A) were observed in domain II and three substitutions (R508G, K538E and E594N) were observed in domain III. In addition to residue substitution, a deletion of 16 residues in the N-terminal part of the Cry8Ka5 protein was observed, and this deletion was responsible for the reduced size of the mutant as compared to Cry8Ka1 (not shown). Additional sequence analyses revealed that the five conserved blocks in the primary structure that were previously defined in typical Cry toxins [10,16,40] were retained in both the Cry8Ka1 parental molecule and the shuffled Cry8Ka5. According

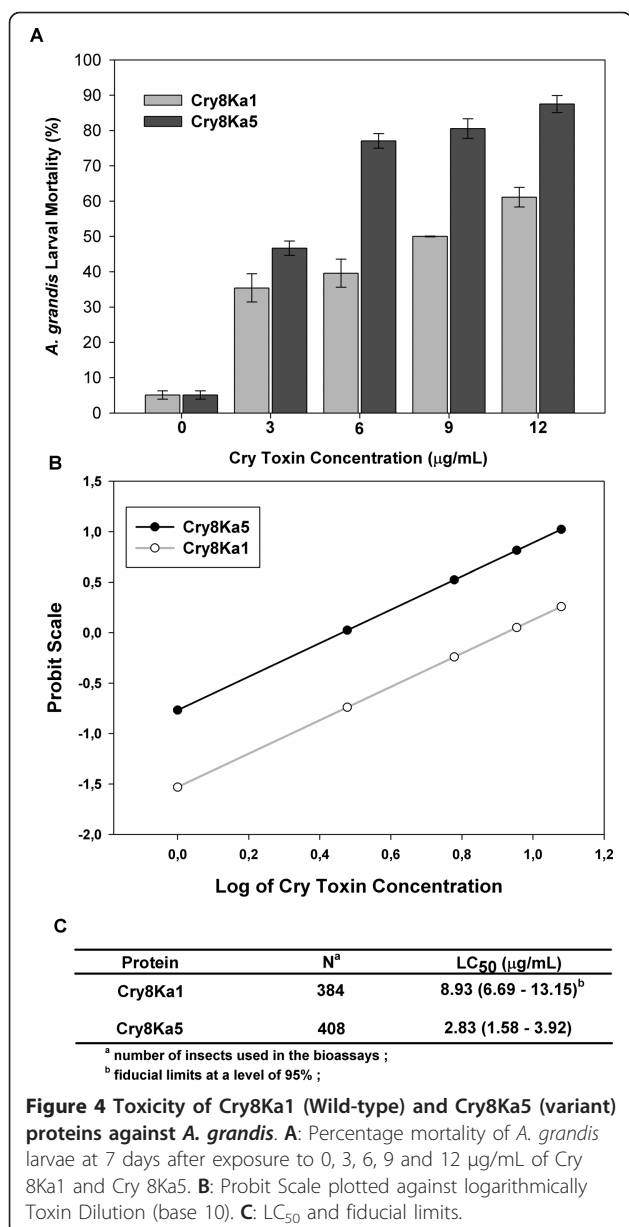
**Table 1** Bioassay showing larvicidal activity including Cry8Ka1 toxin, the others toxins encoded by the seven selected gene variants and VCSM13 Phage (as negative control) using *A. grandis* larvae

Treatment	N	Lethality Mean (%) ± SD	SEM
VCSM13 Phage (Control)	6	20.55 ± 2.50 b <sup>1</sup>	1.02
Cry8Ka1 (Wild-type)	5	29.33 ± 5.47 a,b	2.44
Cry8Ka2	5	36.66 ± 5.77 a,b	2.58
Cry8Ka3	5	49.33 ± 6.30 a	2.81
Cry8Ka4	6	33.88 ± 11.95 a,b	4.88
Cry8Ka5	4	50.00 ± 11.54 a	5.77
Cry8Ka6	6	32.77 ± 15.22 a,b	6.21
Cry8Ka7	6	44.44 ± 19.16 a,b	7.82
Cry8Ka8	5	45.99 ± 17.50 a,b	7.82

10 µg/ml of expressed phage were used in every treatment

N, number of bioassays (12 larvae/replicate); SD, standard deviation; SEM, Standard Error Mean.

<sup>1</sup> Results indicated with the same letter have no statistical difference between treatments (p < 0,05).



to multiple sequence alignments (Figure 7), the Cry8Ka toxins studied here had all of the highly conserved residues (highlighted in green colour) except for residue R, which was substituted to S in position 271. There seems to be no obvious functional consequence of this substitution.

In addition, molecular homology analyses performed using three-dimensional models constructed in this study showed identical folding to Cry8Ka5 such that Cry toxins were included in the group of three-domain Cry toxins. The structural alignments using Cry8Ka1 and Cry8Ka5 protein sequences indicated the three best results showing 34.7; 35.4 and 35.7% of identity with Cry8Ea1 (3EB7.pdb) [16], Cry3Aa (1DLC.pdb) [41] and

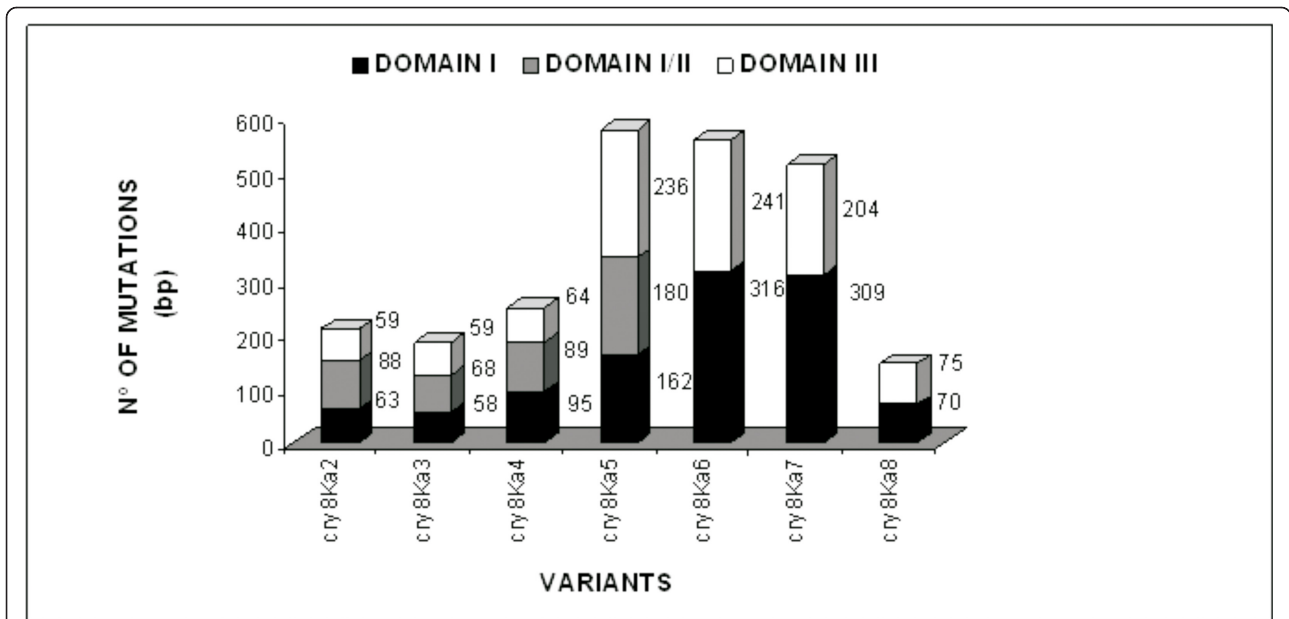
Cry3Bb1 (1JI6.pdb) [42], respectively. Our proposed model for Cry8Ka toxins was obtained from structural alignments submitted to Modeller (as detailed in Materials and Methods) and is illustrated in Figure 6. The final Cry8Ka1 and Cry8Ka5 structural models were chosen based on similar and uniform distribution of amino acids in a Ramachandran plot (93% favourable residues, 6.2% residues in allowed locations; 0.8% unfavourable residues for Cry8Ka1 and 92.6% favourable residues, 6.6% residues in allowed locations; 0.8% unfavourable residues for the shuffled Cry8Ka5) and on DOPE analysis. The DOPE residue-by-residue energy profiles for the final models (not shown) suggested that the models were of high quality.

The Cry8Ka1 and Cry8Ka5 mutant models had the same backbone structure and differed only in the mutated side chains. Due to the very low sequence identity found in the N- and C-termini when compared to the template, these regions were not modelled. As shown in Figure 6, the Cry8Ka toxin model presents the three conserved domains (I, II and III) typical of Cry toxins. The positions of residues replaced in the shuffling process can be better seen in Figures 6b-d, in which the individual domain structures are illustrated. All mutations are localised at the surface and exposed to the solvent. In the Cry8Ka1 model, domain I consists of residues 1-238, domain II contains residues 239-450 and domain III includes residues 451-594.

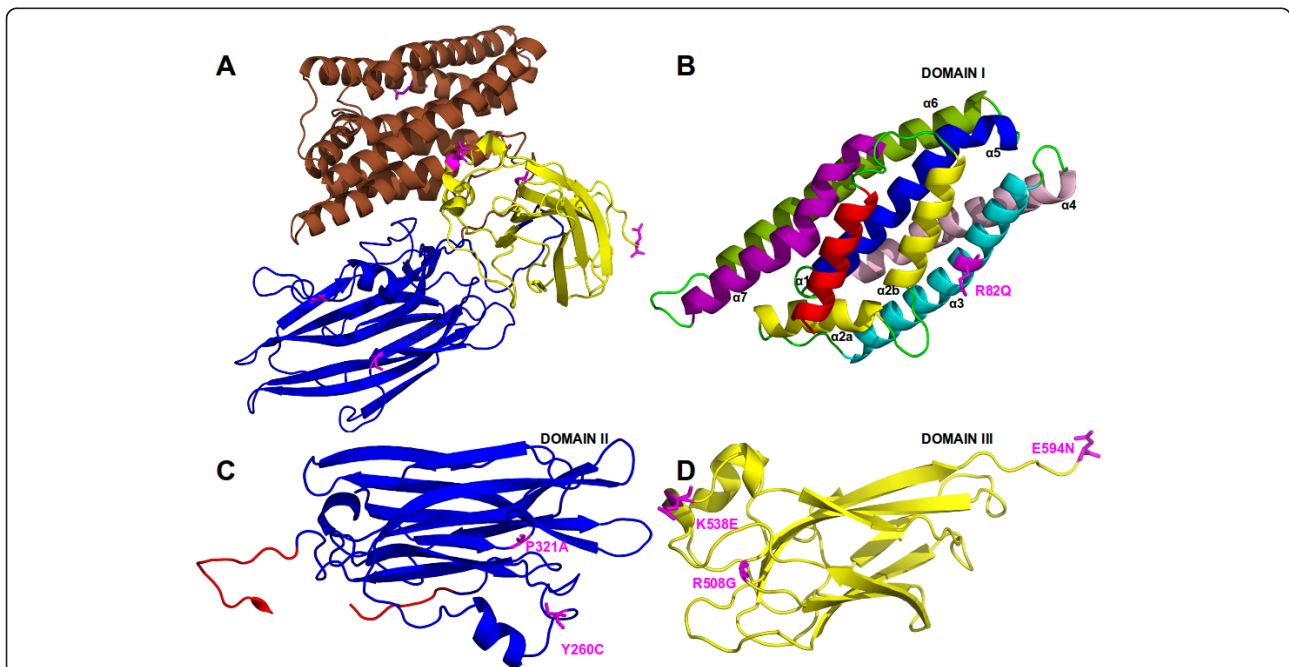
#### 4. Discussion

In this work, the *cry8Ka1* gene was used as a substrate for DNA shuffling. This gene was isolated from the *B. thuringiensis* S811 strain [25] and codes for a 668 residue protein with the conserved three domain structural architecture typical of Cry toxins. The Cry8Ka1 toxin has been shown to be moderately toxic to *A. grandis*, and our research focused on the molecular improvement of the Cry8Ka1 toxin. The challenge was to introduce changes in the primary structure and thereby achieve improved insecticidal activity.

The combined strategy using DNA shuffling and phage display techniques resulted in a combinatorial library containing 10<sup>5</sup> variants. The efficiency of the DNA shuffling approach to improve specificity and to broaden the spectrum of insects controlled by Bt toxins was first mentioned in experiments using the *cry1Ca* gene. Screening of a *cry1Ca*-shuffled library for activity against *Spodoptera frugiperda* revealed a Bt toxin variant showing 3.8-fold higher LC<sub>50</sub> when compared to the wild-type. In other experiments, Cry1Ca variants tested against *S. exigua* showed 6.7-fold higher activity than wild-type Cry1Ca. In addition, the same variants were active against both *Heliothis zea* and *S. exigua* [20].

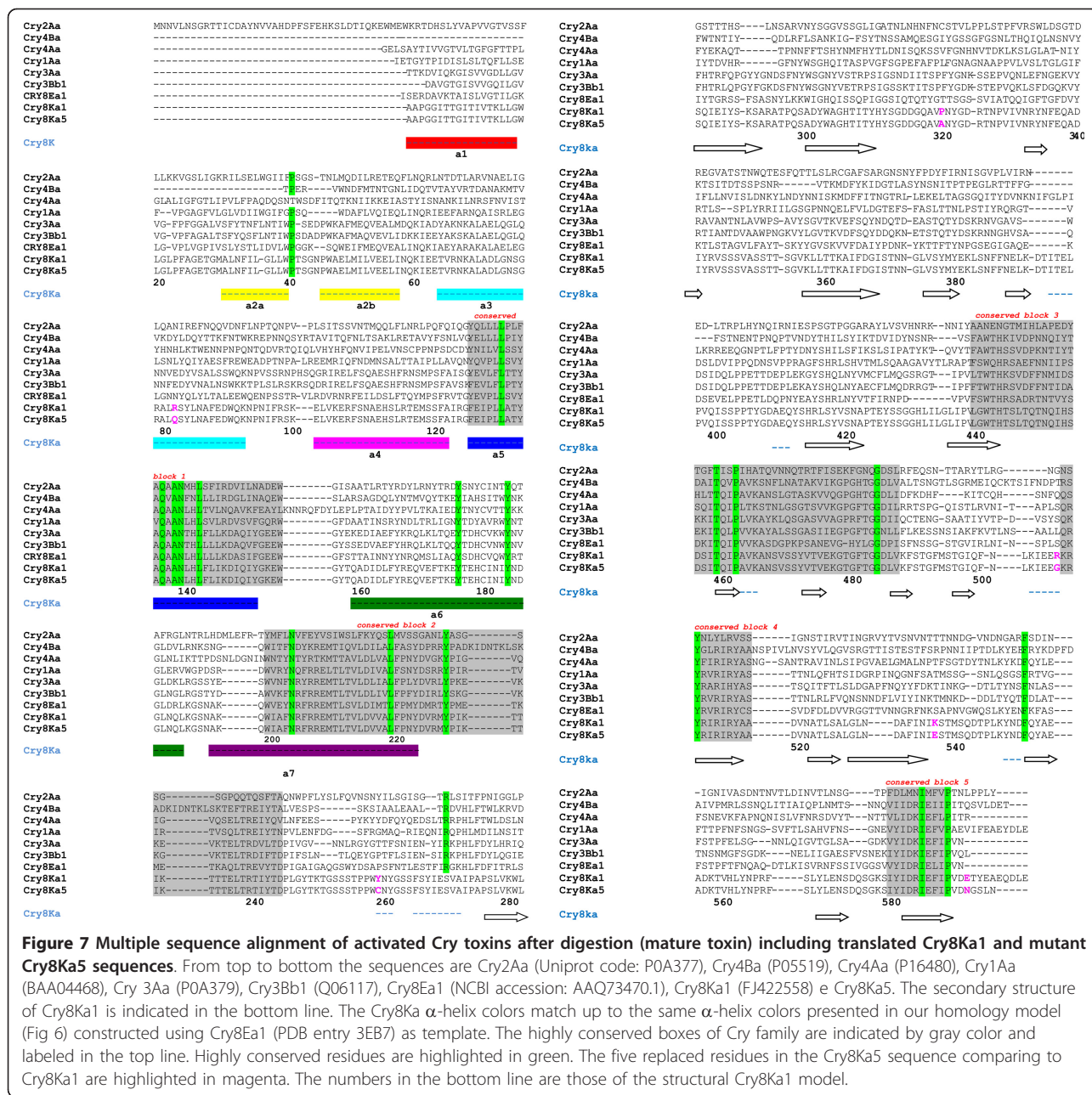


**Figure 5** Graphic representation indicates number of substitutions in the nucleotide sequences, distributed among the three domains for that seven selected *cry8Ka1* variants. The sequences of variants named *cry8Ka2*, *cry8Ka3*, *cry8Ka4*, *cry8Ka5*, *cry8Ka6*, *cry8Ka7* and *cry8Ka8* were fully sequenced and aligned using *cry8Ka1*. In black color, indicate domain I, in gray color, domain II and white color, domain III. In each variant a large number of nucleotide mutations was observed. The *cry8Ka5* variant contained 578 nucleotide substitutions in total.



**Figure 6** Ribbon diagrams of the Cry8Ka1 structural model produced with PyMOL [39] and indicating the positions of the amino acid substitutions obtained in Cry8Ka5 toxin. A: The whole molecule showing the three domains (Domain I in brown color, II in blue color and III in yellow color). Cry8Ka5 substituted residues are highlighted in magenta color. In B, Domain I, composed of eight  $\alpha$ -helices, is shown. The position of the R82Q mutation is indicated on helix  $\alpha_3$  (also indicated in Fig 7). In C, the anti-parallel  $\beta$ -sheets of domain II, indicating two substituted residues in Cry8Ka5 toxin: Cys and Ala in positions 260 and 321, respectively. In D, the jelly-roll  $\beta$ -sheets of Domain III, and the three other mutated residues: Gly at position 508, Glu at 538 and Asn at 594.





When screening genes for naturally occurring genetic variability or for artificially generated variability as performed in this study, the major concern is the choice of an optimal selection system that guarantees efficient screening of mutants containing the desired characteristics. The technique of displaying molecules on the phage surface [43-45] has been widely applied to select antibody chains, to identify receptor ligands, to define enzyme substrates, and to select anticoagulant activities and proteinase inhibitors [46-49]. In addition, phage display systems have proven to be a useful tool for studying toxins with binding domains such as Cry toxins

[24]. In the present study, we applied phage display methodology using M13 filamentous phage; we chose to couple this strategy to DNA shuffling because Cry toxins are AB-type toxins, which have been shown to be suitable targets for directed evolution [50,14]. As discussed in a previous study from our group [24], similar studies have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. In this study, the bioassays using Cry8ka5 recombinant protein confirmed the molecule's effectiveness and emphasised the need to establish better conditions to help overcome constraints to successfully express Cry protein variants

with the M13 phage display system. The mortality found from negative control in the first screening bioassays was due the M13 phage system. The bioassays using boll weevil artificial diet as here described represent a routine in our researches aimed to investigate the potential of novel molecules against boll weevil larvae. However, it is clear that for biotechnology purpose, e.g. production of insect-resistant plants, further tests must be conducted using boll weevils in presence of the genetic modified plants containing the selected variant genes. In the present work the selected Cry8Ka5 mutant toxin with improved activity against the insect target had six residue substitutions distributed throughout the three domains and a shorter N-terminal end than the wild-type Cry8Ka1. Because the selected mutant toxin was 3.1 times more active than the parental Cry8Ka1 toxin and 81.3 times more active than the Cry1Ia12 toxin [25], we concluded that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil.

We modelled the three-dimensional structures of the Cry8Ka1 toxin and the Cry8Ka5 mutant toxin by using the three-dimensional crystal structure of activated Cry8Ea1 (3EB7.pdb) toxin [16] as templates for homology modelling. Cry8 and Cry3-type toxins are active against a number of coleopteran pests; however, Cry8Ea1 showed specific toxicity against *Holotrichia parallela* (Scarabaeidae) [16]. Although Cry coleopteran toxins have not been as extensively studied as Cry1A, it has been shown that, as for Cry1A lepidopteran-specific toxins, the pore formation activity of Cry3 toxins depends on the formation of an oligomeric pre-pore structure after the interaction of protoxins with BBMV midgut cells from the Colorado potato beetle [51]. One previously reported theory is that the helix bundle in domain I is directly responsible for membrane penetration and pore formation after Cry toxins bind the specific receptors on the surface of the insect midgut [16]. In support of this theory, our Cry8Ka toxin models confirmed the presence of a seven-helix bundle, as has been generally described, and we also visualised the helix  $\alpha 2$  separated in two helices (Figure 7), which is conserved among Cry toxin structures [16]. According to previous authors, the  $\alpha 2$  helix break could be related to the mobility of the lid on the helix bundle during correct receptor recognition. At that moment, the lid comprising helix  $\alpha 2b$  and loop  $\alpha 2b$ -  $\alpha 3$  must be removed from the top of the helix bundle to release the helical hairpin  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ . Based on mutagenesis studies, the same authors discussed the significance of the conserved Pro-41 residue (residue number correspondent to primary structure of the Cry8Ka toxins - Figure 7) in maintaining the stability of Cry8Ea1. According to a more recent model

proposed for the initiation of Cry toxin domain disassembly, Pro-41 could be the key in facilitating the lid-opening starting from a stable conformation [16]. Based on these structural analyses, we suggest that the DNA shuffling strategy applied here was able to generate mutations without causing conformational changes that could affect the stability of a new toxin. Regarding the involvement of the domains II and III in the Cry toxin mechanism, a combination of site-directed mutagenesis and membrane binding studies [52] showed that the exposed loops of domain II on Cry3A are involved in receptor binding and that mutations can affect binding, resulting in increased or decreased toxicity. Loop 1 and loop 3 in domain II of Cry3A are directly involved in receptor binding. In addition, the same authors suggested that the loop III region might play a role in irreversible binding or membrane insertion. One of the mutations created by the cry8Ka1 gene shuffling procedure is localised in loop 3 of domain II in Cry8Ka5. However, neither of the two mutations in domain II of Cry8Ka5 is located in these loops.

Our results indicated that most structural features of the highly conserved residues are present in the Cry8Ka modelled structures. Given that our experiments to determine the specific receptors for Cry8Ka1 toxins are currently in development, the use of the molecular modelling results to explain how differences in toxicity could be caused by the specific residues changes is somewhat speculative. A cDNA library constructed using intestinal material from cotton boll weevil larvae will be used to screen receptor proteins. We hope that studies involving receptor-toxin interactions will allow us to elucidate the binding differences and increased toxicity related to the replaced residues in the three domains of the Cry8Ka5 mutant.

## 5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil. With its improved toxicity against the cotton boll weevil, a major cotton insect-pest, the *cry8Ka5* gene has the potential to be used in plant transformation experiments to produce genetically modified cotton plants that are *A. grandis*-resistant. Our modelling studies show conservation of core residues in the Cry8Ka5 toxin structure, suggesting that the mutations altering activity should not affect molecular stability.

## 6. Acknowledgments

The present work was performed by grants from Brazilian government (CNPq, CAPES and EMBRAPA). The authors thank: Dr. Andréa Maranhão, (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage display approaches.

#### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF, Brasil. <sup>2</sup>Embrapa Algodão - Campina Grande, PB, Brasil. <sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5 Norte -Brasília, DF, Brasil. <sup>4</sup>Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK. <sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. <sup>6</sup>Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB, Brasília, DF, Brasil. <sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos-UFP, Curitiba, PR, Brasil.

#### Authors' contributions

GRO have carried out all experiments involving in vitro directed molecular evolution studies, and also carried out experiments aiming overexpression of recombinant proteins and its application into bioassays; MCMS carried out design and biopanning experiments, molecular modeling studies and involved in drafting the manuscript; WAL participated of constructions of structural models and drafted the manuscript; EYTN contributed to molecular characterization of the selected molecules; AAPF participated of sequence analysis, protein modeling, and have been involved in drafting the manuscript; MAB carried out the immunoassays; DSLS contributed to analysis and interpretation of data; JEGJ carried out BBMV proteins preparation and participated to Phage display experiments; JDASJ participated in the design of the study, sequence analysis, vector construction for bacterial expression, drafting the manuscript and performed the statistical analysis DJR has been participated in the molecular structural studies and involved in revising of the manuscript critically; HBR participated of DNA shuffling experiments and bioassays; CRS coordinated studies and obtain recombinant protein expression; MFGS coordination of the research group carried out all design experiments and data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 5 April 2011 Accepted: 9 September 2011  
Published: 9 September 2011

#### References

1. Silvie P, Leroy T: *Manual de identificação das pragas e seus danos no algodoeiro.Cascavel: COODETEC* 2001.
2. Scataglini MA, Lanteri AA, Confalonieri VA: Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetica* 2006, **126**:353-362.
3. Martins WFS, Ayres CFJ, Lucena WA: Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the new World. *Genet Mol Res* 2007, **6**(1):23-32.
4. Nakasu EYT, Firmino AAP, Dias SC, Rocha LT, Ramos HB, Oliveira GR, Lucena WA, Carlini CR, Grossi-de-Sa MF: Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J Invertebr Pathol* 2010, **104**(3):227-230.
5. Layton B: **Boll weevil eradication effort**. [http://deltafarmpress.com/boll-weevil-eradication-effort].
6. Johnson J, Kiawu J, MacDonald S, Meyer L, Rosera E, Skelly C: **THE UNITED STATES AND WORLD COTTON OUTLOOK**. [http://www.usda.gov/oce/forum/2011\_Speeches/2011-Cotton.pdf].
7. James C: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* Ithaca: ISAAA; Executive Summary; 2008.
8. Bravo A, Soberón M: **How to cope with insect resistance to Bt toxins?** *Trends Biotechnol* 2008, **26**(10):573-579.
9. James C: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* Ithaca: ISAAA; Executive Summary; 2009.
10. Höfte H, Whiteley HR: **Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis***. *Microbiol Rev* 1989, **53**:242-255.
11. Silva-Werneck JO, Ellar DJ: **Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis***. *J Invertebr Pathol* 2008, **98**:320-328.
12. Pigott CR, Ellar DJ: **Role of Receptors In *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**:255-281.
13. Soberon M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A: **Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance**. *Science* 2007, **e318**(5856):1640-1642.
14. Fernández LE, Gómez I, Pacheco S, Arenas I, Gilla SS, Bravo A, Soberón M: **Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins**. *Peptides* 2008, **29**:324-329.
15. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr: **A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis***. *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:9897-9902.
16. Guo SY, Ye S, Song FP, Zhang J, Wei L, Shu CL: **Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela***. *J Struct Biol* 2009, **168**:259-266.
17. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J: **Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity**. *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:15196-15199.
18. Stemmer WPC: **Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling**. *Lett Nat* 1994, **370**:389-391.
19. Zhao H, Arnold FH: **Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination**. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:1307-1308.
20. Lassner M, Bedbrook J: **Directed molecular evolution in plant improvement**. *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**:152-156.
21. Rosic NN, Huang W, Johnston WA, James J, Devos JJ, Gillam EMJ: **Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling**. *Gene* 2007, **395**:40-48.
22. Grossi-de-Sa MF, Magalhães MTQ, Silva MS, Silva SMB, Dias SC, Nakasu EYT, Brunetta PSF, Oliveira GR, Oliveira-Neto OB, Oliveira RS, Soares LHB, Ayub MAZ, Siqueira HAA, Figueira ELZ: **Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry11a-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain**. *J Biochem Mol Biol* 2007, **40**:773-782.
23. Willats WGT: **Phage display: practicalities and prospects**. *Plant Mol Biol* 2002, **50**:837-854.
24. Craveiro KIC, Gomes Júnior JE, Silva MCM, Macedo LLP, Lucena WA, Silva MS, Antonino de Souza JD Júnior, Oliveira GR, Magalhães MTQ, Santiago AD, Grossi-de-Sa MF: **Variant Cry11a toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer**. *J Biotechnol* 2010, **145**:215-221.
25. Grossi-de-Sa MF, Oliveira GR, Silva MCM, Rocha TL, Magalhães MTQ: **Molécula de ácido nucléico isolada, construção gênica, vetor, célula transgênica, método para obtenção de uma célula e de uma planta transgênica, polipeptídeo isolado e purificado, composição pesticida biodegradável, método para o controle de uma praga, método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga**. *INPI Patent 012090001018* 2009.
26. Wolfsberger M, Luethy P, Maurer A, Parenti P, Sacchi FV, Giordana B, Hanozet GM: **Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*)**. *Comp Biochem Physiol* 1987, **86**:301-308.
27. Bradford MM: **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
28. Andris-Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas CF III: **Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display**. *J Immunol Methods* 2000, **242**:159-181.
29. Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ: *Phage Display: A Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
30. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4**. *Nature* 1970, **227**:680-685.
31. Finney DJ: *Probit Analysis* Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
32. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
33. Staden R: **The Staden Sequence Analysis Package**. *Mol Biotechnol* 1996, **5**:233-241.
34. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
35. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792-1797.
36. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE: **The Protein Data Bank**. *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(1):235-242.
37. Sali A, Blundell TL: **Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints**. *J Mol Biol* 1993, **234**:779-815.

38. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM: **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** *J Appl Crystallogr* 1993, **26**:283-291.
39. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.** Schrödinger, LLC.
40. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **62**:775-806.
41. Li J, Carrol J, Ellar DJ: **Crystal structure of insecticidal  $\alpha$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution.** *Nature* 1991, **353**:815-821.
42. Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L: **Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*.** *Acta Crystallogr Sect D* 2001, **57**:1101-1109.
43. Kasman LM, Lukowiak AA, Garczynski SF, McNall RJ, Youngman P, Adang MJ: **Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:2995-3003.
44. Vilchez S, Jacoby J, Ellar DJ: **Display of Biologically Functional Insecticidal Toxin on the Surface of  $\lambda$  Phage.** *Appl Env Microbiol* 2004, **70**:6587-6594.
45. Pacheco S, Gómez I, Sato R, Bravo A, Soberón M: **Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage.** *J Invertebr Pathol* 2006, **92**:45-49.
46. Barbas CF III, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA: **Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem.** *Proc Natl Acad Sci* 1992, **89**:4457-4461.
47. Wang CI, Yang Q, Craik CS: **Isolation of a high affinity inhibitor of urokinase-type plasminogen activator by phage display of ecotin.** *J Biol Chem* 1995, **270**:12250-12256.
48. Kiczak L, Kasztura M, Koscielska-Kasprzak K, Dadlez M, Otlewski J: **Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage library of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI).** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1550**:153-63.
49. Maun RH, Eigenbrot C, Lazarus RA: **Engineering Exosite Peptides for Complete Inhibition of Factor VIIa Using a Protease Switch with Substrate Phage.** *J Biol Chem* 2003, **278**:21823-21830.
50. Ishikawa H, Hoshino Y, Kawahara T, Kitajima M, Kitami M, Watanabe A, Bravo A, Soberon M, Honda A, Katsuro Yaoi K, Sato R: **A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*.** *Mol Biotechnol* 2007, **36**:90-101.
51. Rausell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-Ramírez AC, Real MD, Bravo A: **Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say).** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1660**:99-105.
52. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH: **Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop.** *FEES Lett* 2000, **473**:227-232.

doi:10.1186/1472-6750-11-85

**Cite this article as:** Oliveira et al.: Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology* 2011 11:85.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

