

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV

**PIRAMIDAÇÃO GÊNICA PARA RESISTÊNCIA
HORIZONTAL A NEMATÓIDES VIA SILENCIAMENTO
GÊNICO**

RODRIGO ABDUL KHALEK BORGES

BRASÍLIA - DF
2016

RODRIGO ABDUL KHALEK BORGES

**PIRAMIDAÇÃO GÊNICA PARA RESISTÊNCIA
HORIZONTAL A NEMATÓIDES VIA SILENCIAMENTO
GÊNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Banca Examinadora da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária como exigência final para
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

Orientador: Dr. Rodrigo Rocha Fragoso

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michelle Souza
Vilela

BRASÍLIA - DF
2016
PIRAMIDAÇÃO GÊNICA PARA RESISTÊNCIA HORIZONTAL A
NEMATÓIDES VIA SILENCIAMENTO GÊNICO

RODRIGO ABDUL KHALEK BORGES

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO AGRÔNOMO.

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

MICHELLE SOUZA VILELA, Dr^a. Universidade de Brasília
Professora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB
(ORIENTADORA) CPF: 919.623.401-23; e-mail: michellevilelaunb@gmail.com

RODRIGO DA ROCHA FRAGOSO; Dr. Embrapa Cerrados
Pesquisador da Embrapa Cerrados
(EXAMINADOR) CPF: 669.875.631-87; e-mail: rodrigo.fragoso@embrapa.br

RENATO FERNANDO AMABILE; Dr. Embrapa Cerrados
Pesquisador da Embrapa Cerrados
(EXAMINADOR) CPF: 239.382.421-91; e-mail: renato.amabile@embrapa.br

BRASÍLIA - DF

Julho / 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A toda minha família que sempre me apoio durante estes anos de graduação, em especial aos meus pais, Ricardo e Najla, e minha irmã, Luiza.

A todos meus professores da Universidade de Brasília, que sempre repassaram seus conhecimentos para contribuírem com minha formação de Engenheiro Agrônomo.

Aos meus colegas de curso da agronomia, que me ajudaram de alguma forma durante todos estes anos de curso, em especial para todos do 2º/2010.

A todos do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, que me passaram tantos conhecimentos teóricos e práticos durante os dois anos em que lá estive. O especial fica para: Isabela, François, Fatima, Érika, Rodrigo, Reneida, Thuanne, Dagna, Deisy e tantos outros que passaram durante esses anos.

Aos meus diversos outros amigos que estiveram presentes de alguma forma durante minha graduação, como o pessoal da Liga e a galera do Anf 17. O especial vai para: Adyne, Amanda, Ana Terra, Anne, Bia, Bianca, Carlos, Cristiane, Cidade, Dematte, Diego, Dilene, Eric, Felipe, Hugo, Ingrid, Izabela, Jessica, João, Joyce, Julia, Lara, Lorrane, Louise, Lucca, Luisa, Mayara, Mariya, Mônica, Nayane, Nunes, Taynara, Teci, Saulo, Stefanie, Victor, Walser e tantos outros que não caberiam aqui!!

RESUMO

O fitonematoide causador da galha *Meloidogyne incognita* é uma praga que causa grandes impactos a diversas culturas agrônômicas ao redor do mundo. É um dos patógenos de maior relevância da atualidade e no Brasil causa danos a plantas de algodão, soja, café, cana-de-açúcar e muitas outras *commodities*. A pesquisa realizada no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia têm como objetivo a piramidação dos genes para o controle deste fitonematoide. Sequências para expressão de RNA dupla fita (dsRNA) visando o silenciamento (via RNAi) de dois genes-alvo essenciais ao metabolismo do nematoide *M. incognita* foram previamente validadas por qPCR e bioensaios. Este trabalho consiste na piramidação, ou seja, a junção destas sequências por estratégias de cruzamentos entre plantas contendo os dois cassetes de expressão de dsRNA dos genes selecionados que apresentaram maior eficiência ao controle do *M. incognita*. Espera-se que a piramidação cause efeito deletério aditivo e evite, ou pelo menos atrase o surgimento de resistência dos fitopatógenos. Foram utilizadas plantas expressando dsRNA para Isocitrato Liase (IL), que atua no ciclo do glioxilato, e plantas expressando o dsRNA para a Proteína de Choque Térmico 90 (*hsp90*), que possui papel essencial no enovelamento e transporte de proteínas.

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

ABSTRACT

The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is a pest that causes the major impacts to several agronomic cultures around the world. It is one of the most relevant pathogens of the current days, and in Brazil causes damage to cotton, soybean, coffee, sugarcane and many other commodities. The research carried at the Molecular Interaction Laboratory Plant-Pest (LIMPP) at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology aims to pyramiding genes to control this phytonematode. Sequences for expression of double-stranded RNA (dsRNA) aimed silencing (using RNAi) two target genes essential to the nematode *M. incognita* metabolism that were previously validated by qPCR and bioassays. This work consists in pyramiding, that is, the junction of these sequences by crossing strategies of tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) containing dsRNA expression cassettes of the selected genes that showed greater efficiency to control *M. incognita* in. It is expected that the pyramiding should cause harmful additive effect and prevent the emergence of resistance of pathogens. Plants were used to express dsRNA of Isocitrate lyase (IL), which operates in the glyoxylate cycle, and plants expressing dsRNA to heat shock protein 90 (*hsp90*) having essential role in the folding and transport proteins.

Keywords: Pyramiding, phytonematode, *Meloidogyne*, RNA interference, gene silencing, *Nicotiana tabacum*

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DE VIDA DO NEMATOIDE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>.....	16
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ABSORÇÃO DE RNAI PELO NEMATOIDE.....	18
FIGURA 3: JUVENIL DE SEGUNDO ESTÁDIO DE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> RECÉM-ECLODIDO	19
FIGURA 4: PLANTAS DE TABACO EM CASA DE VEGETAÇÃO	24
FIGURA 5: FLORES DE <i>N. TABACUM</i> NO ESTÁDIO MA.	24
FIGURA 6: FRUTOS DE <i>N. TABACUM</i>.	25
FIGURA 7: AMPLIFICAÇÕES DE FRAGMENTOS GÊNICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA F 29	
FIGURA 8: AMPLIFICAÇÕES DE FRAGMENTOS GÊNICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA G 29	
FIGURA 9: AMPLIFICAÇÕES DE FRAGMENTOS GÊNICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA F E H.....	30
FIGURA 10: AMPLIFICAÇÕES DE FRAGMENTOS GÊNICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA J, K, L E M	30

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA EXPRESSÃO DE RNAI PARA DIVERSOS FINS DE RESISTÊNCIA E MELHORIAS AGRONÔMICAS..... 17

TABELA2: EVENTOS DE TRANSFORMAÇÃO REALIZADOS..... 27

TABELA 3: CRUZAMENTOS DE EVENTOS REALIZADOS..... 28

TABELA 4: EVENTOS DE TRANSFORMAÇÃO E CRUZAMENTOS, E SUAS LETRAS RESPECTIVAS..... 28

ABREVIATURAS

AmpR	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FR	Fator de Reprodução
g	Grama
G	Força centrífuga relativa
GM	Geneticamente modificada
HSP 90	Proteína de Choque Térmico 90
IL	Isocitrato Liase
kb	Kilobase
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampere

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NFC	Nematoide formador de cisto
NFG	Nematoide formador de galha
NT	Não Transgênica
ng	Nanograma
OD	Densidade ótica
pb	Par de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação polimerásica em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
qRT-PCR	PCR quantitativo, PCR em tempo real

rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RNAi	RNA interferente
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
rRNA	RNA ribossomal
siRNA	RNA interferente pequeno
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
μF	Micro Faraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVO	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Os NEMATOIDES.....	15
3.2 TÉCNICA DO RNAi	16
3.3 PIRAMIDAÇÃO	19
3.4 GENE ISOCITRATO LIASE	20
3.5 GENE PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 90 – <i>HSP90</i>	21
3.6 PONTO DE INÍCIO.....	22
4.METODOLOGIA	23
4.1 CULTIVO	23
4.2 CRUZAMENTO (PIRAMIDAÇÃO)	24
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	25
4.4 GENOTIPAGEM POR PCR.....	26
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	277
5.1 CRUZAMENTOS E PROPAGAÇÃO.....	27
5.2 GENOTIPAGEM POR PCR	288
6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	31
7.REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Causadores de grandes danos à agricultura mundial, os nematoides constituem como uma praga que necessita de severa atenção. Por ser de difícil controle e quase impossível sua eliminação das áreas agricultáveis, os esforços têm se tornados caros e exaustivos. Os custos anuais à agricultura causados pelos danos dos nematoides chegam a US\$157 bilhões por ano (LOURENÇO-TESSUTTI, et al., 2015).

Os quatro principais métodos de controle dos fitonematoides se baseiam em: controle químico, controle biológico, prática de manejo e quarentena (LOURENÇO, 2014). No controle químico, técnica que utiliza nematicidas sintéticos de custo elevado, observa-se o risco de contaminação do ambiente e intoxicação do agricultor (JEYARATNAM, 1990). Além de se tornarem ineficientes aos nematoides endoparasitas, já que estes passam a maior parte da vida no interior das raízes das plantas. O gasto com estes agrotóxicos podem ser até três vezes superiores a soma dos gastos com controle de outros patógenos (BIRD, 2003). As boas práticas de manejo, como a rotação de culturas, não apresentam os resultados esperados devido ao aumento da área de produção e dos hábitos polípagos das principais espécies como *M. incognita* e *M. javanica* (LOURENÇO, 2014 apud TRUDGILL; BLOK, 2001). Visto que estes métodos não apresentam a eficiência necessária, o cultivo de variedades naturalmente resistente vem sendo a melhor opção, mas a resistência se restringindo a determinadas raças vem sendo a maior dificuldade (NG'AMBI, et al., 1999).

Com o advento da engenharia genética, utilizando-se de estratégias moleculares que visam induzir resistência em plantas a diversos patógenos, vem se abrindo novos campos de estudos e possibilidades. O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM), com resistência a nematoides, pode aumentar a produtividade, diminuir os custos e reduzir os impactos do uso de nematicidas (LOURENÇO, 2014).

2. Objetivo

2.1 **Objetivo Geral:**

O objetivo deste projeto foi realizar a piramidação gênica por meio do cruzamento de plantas de tabaco GM para expressão de dsRNA do gene Isocitrato Liase com plantas expressando o dsRNA do gene *hsp90*.

2.2 **Objetivos específicos**

- Multiplicar eventos GM de IL e *hsp90*
- Genotipar indivíduos T3 de IL e *hsp90* por PCR
- Efetuar cruzamentos por polinização artificial
- Propagar cruzamentos
- Genotipar cruzamentos por PCR

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Os Nematoides

O filo Nematoda é um dos grupos mais abundantes da biosfera, podendo representar 80% do Reino Animalia (LOURENÇO, 2014 apud PLATT, 1999). Já foram descritas mais de 26.500 espécies sendo que mais de 4.100, ou 15%, dessas são parasitas de plantas e quase 12.000 de zooparasitas. Contudo, podemos estimar um número aproximado de 1 milhão de espécies (HUGOT, 2001; FERRAZ & BROWN, 2016).

Dos fitonematoides, endoparasitas sedentários das raízes, os causadores de maior dano na agricultura são pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoides formadores de galhas (NFG). *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* e *Meloidogyne hapla* são as quatro espécies que correspondem a 95% das infestações e 5% da perda da colheita anual (SASSER, et al., 1983). Embora faltem dados atuais precisos sobre os danos causados e as perdas resultantes, a estimativa de perda anual global devida a fitonematoides contida em artigo publicado em 2011 dava conta de que tal valor já excedia a 80 bilhões de dólares americanos, o que, segundo alguns especialistas, ainda representa montante abaixo do verdadeiro (FERRAZ; BROWN, 2016).

Os NFG têm seu desenvolvimento em 6 estádios fenológicos separados por ecdises: ovo, quatro juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adulto (**Figura 1**). Este ciclo de vida depende das condições ambientais e podem durar de 6 a 8 semanas (LOURENÇO, 2014).

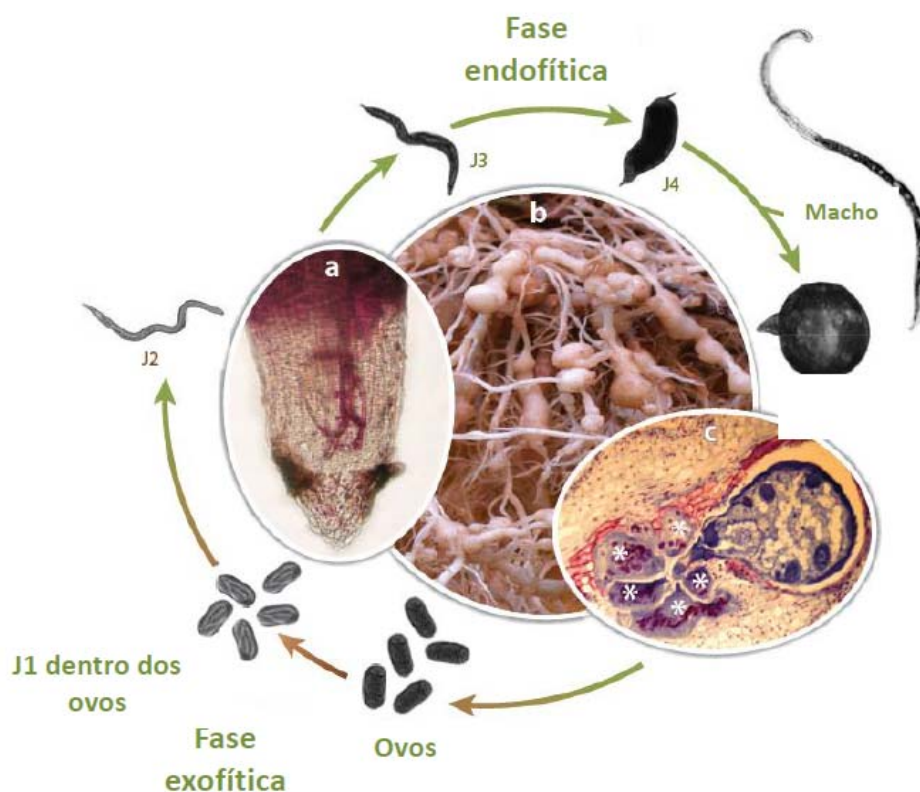


Figura 1: Ciclo de vida do nematoide *Meloidogyne incognita*.

Devido à íntima e sofisticada interação molecular planta-nematoide os endoparasitas sedentários habitam o hospedeiro interna e permanentemente: (1) juvenil 2 eclode do ovo; (2) juvenil 2 migra no solo, localiza e invade raízes; (3) formação do sítio de alimentação e ecdise em juvenil 3; (4) ecdise em juvenil 4 e diferenciação de desenvolvimento, formando macho de vida livre em condições desfavoráveis ou fêmea adulta parasita; (5) fêmea adulta deposita ovos em massa gelatinosa; (6) ovos são liberados no solo ou continuam na raiz original, completando o ciclo de vida (LOURENÇO, 2014).

3.2 Técnica do RNAi

O RNA interferente é um processo altamente conservador que ocorre naturalmente nas células de organismos eucarióticos. Este evento promove a degradação do mRNA antes de sua tradução (OBBARD, et al., 2009). Este processo também é responsável pela regulação da expressão genica em várias plantas (LOURENÇO, 2014 apud LILLEY, et al., 2007).

Através de vetores, sequências gênicas para a expressão do RNA fita dupla (dsRNA) são introduzidos nas plantas alvo. Estas sequências, chamadas de construções gênicas, ou cassetes de expressão, possuem uma região espaçadora ou íntron entre duas sequências invertidas repetidas e o transcrito resultante forma uma estrutura em forma de grampo, denominada hpRNA (hairpin RNA = grampo de RNA) (LOURENÇO, 2014 apud HIRAI, et al., 2007).

A partir do desenvolvimento e esclarecimento sobre este mecanismo de silenciamento, a técnica de utilização do RNAi tem se difundido e se tornado uma excelente ferramenta para pesquisa básica, terapia gênica melhorias agrônômicas ou para resistência a pragas e patógenos (**Tabela 1**).

Tabela 1: Plantas geneticamente modificada para expressão de RNAi para diversos fins de resistência e melhorias agrônômicas.

Vantagem Obtida	Gene-Alvo	Planta	Referência
Biomassa	OsDWARF4	Arroz	Feldmann (2006)
Carotenoides e Flavonoides	DET1	Tomate	Davuluri, et al. (2005)
β -Caroteno e Licopeno	SINCED1	Tomate	Sun, et al. (2012)
Carotenoide	Lycopene epsilon cyclase	Colza	Yu, et al. (2007)
Aumento da Vida de Prateleira	α -Man/ β -Hex	Tomate	Meli, et al. (2010)
Frutos sem Sementes	Chalcone synthase	Tomate	Schijlen, et al. (2007)
Menor Quantidade de Gluten	GluB	Arroz	Kusaba, et al. (2003)
Cebola sem Lagrimas	Lachrymatory factor synthase (LFS)	Cebola	Eady, et al. (2008)
Resistências			
Bean Golden Mosaic Virus (BGMV)	AC1	Feijão	Bonfim, et al. (2007)
Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV)	BYDV-PAV	Barley	Wang, et al. (2000)
Rice Dwarf Virus (RDV)	PNS12	Arroz	Shimizu, et al. (2009)
Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV)	P69	Tabaco	Niu, et al. (2006)
Turnip Mosaic Virus (TuMV)	HC-Pro	Tabaco	Niu, et al. (2006)
<i>Helicoverpa armigera</i>	CYPAE14	Algodão	Mao, et al. (2007)
Corn rootworm	V-ATPase A	Maize	Baum, et al. (2007)
<i>Meloidogyne incognita</i>	Splicing factor and integrase	Tabaco	Yadav, et al. (2006)
<i>Meloidogyne incognita</i>	16D10	Arabidopsis	Huang, et al. (2006)

(Adaptado de AYUSHI, et al. 2015).

Com o sequenciamento do genoma de diversos nematoides, os possíveis genes que compõem as vias de silenciamento estão sendo identificados com base na homologia com o nematoide de vida livre e organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. A identificação desses genes pode ajudar a esclarecer os detalhes moleculares do mecanismo deste fenômeno tão observado em nematoides parasitas de plantas (LOURENÇO, 2014 apud LILLEY, et al., 2012).

A estratégia de produção do dsRNA *in planta* tem elevada eficiência para o controle, tanto dos NFG quanto aos NFC. Os sítios de alimentação destes parasitas geram um caminho ideal para entrada do dsRNA à medida que o nematoide se alimenta na planta (**Figura 2**), permitindo que durante seu ciclo de vida ocorra à absorção contínua do dsRNA (LOURENÇO, 2014).

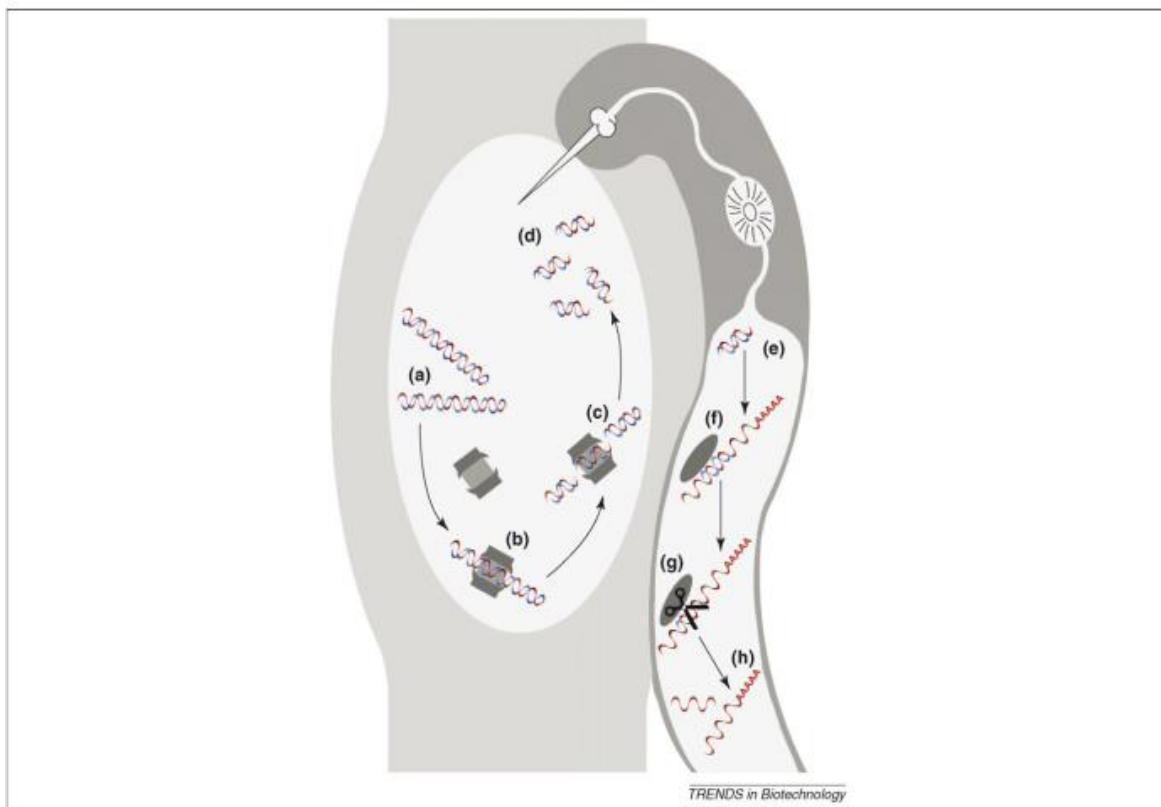


Figura 2: Representação esquemática da absorção de RNAi pelo nematoide

Os nematoides em estágio J2 conseguem perfurar a célula vegetal com seu estilete e criar seu sítio de alimentação, onde ingere o siRNA, fragmentos do RNA clivados pela nuclease Dicer, que são absorvidos no tubo digestivo ocorrendo o silenciamento do gene-alvo (LOURENÇO, 2014). Figura retirada de GHEYSEN e VANHOLME, 2007.

Para que ocorra o silenciamento gênico em nematoides são necessários altos níveis de expressão de dsRNA. Um promotor capaz de gerar este nível de expressão *in planta* é um dos vários fatores que interferem no sucesso da técnica do RNAi para controle de nematoides, bem como para todas as outras pragas que se alimentam dos tecidos (FAIRBAIRN, et al., 2007).

Quando genes-alvos estão envolvidos em processos celulares essenciais, a técnica do RNAi *in planta* se torna mais eficiente. Genes ligados

ao parasitismo apresentam bons resultados, mas não persistentes, pois vários genes homólogos acabam por substituírem suas funções (LOURENÇO, 2014 apud DALZELL, et al., 2011). Por estes motivos, os genes-alvo Isocitrato Liase e *hsp90* foram utilizados neste trabalho e nos anteriores a este projeto, já que são genes essenciais ao metabolismo e, quando silenciados *in planta* demonstraram redução de sucesso reprodutivo de *M. incognita* (LOURENÇO, 2014).

3.3 Piramidação

A piramidação gênica se trata de uma estratégia de cruzamentos direcionados em que se determinam quais plantas serão doadoras das anteras contendo os grãos de pólen e quais terão os grãos de pólen depositados sobre seu estigma, e se faz a polinização artificial. É uma técnica utilizada para formação de híbridos, trazendo genes pertencentes a duas plantas diferentes para uma única.

Esta técnica tem como objetivo a combinação ou introdução de diferentes genes de resistência em uma única cultivar, aumentando tanto o espectro quanto a durabilidade da resistência (ARRUDA, 2009 apud HITTALMANI, 2000). O conceito restrito de piramidação se refere ao acúmulo de genes para conferirem incompatibilidade a diferentes patótipos de um mesmo patógeno, aumentando a resistência e a tornando possivelmente mais durável. No conceito amplo da piramidação, se relaciona a introgressão simultânea de genes de resistência a distintos patógenos, técnica conhecidamente chamada de resistência múltipla (ARRUDA, 2009 apud PEDERSEN; LEATH, 1988).

Neste trabalho utilizaremos o conceito de piramidação restrita, ou seja, os dois genes introduzidos na planta estarão influenciando negativamente o mesmo patógeno, e por se tratarem de genes essenciais a uma vasta gama de fitonematoides de diferentes raças e espécies, o conceito amplo da piramidação também é viável.

3.4 Gene Isocitrato Liase

Ovos de NFG dormentes podem durar vários meses, uma vez que o metabolismo está muito lento. Porém, quando ocorre quebra de dormência de ovos, induzida por fatores ambientais e presença de planta hospedeira, estes passam pelo processo de embriogênese gerando o J1, que após a primeira ecdise, sofre metamorfose para o J2, que eclode em busca de raízes. Após penetração e migração nas raízes, o parasitismo é estabelecido com a formação de células gigantes multinucleadas e, apenas após todas essas etapas, que podem durar semanas, o nematoide se alimenta. Durante este período, são utilizadas reservas lipídicas, encontradas em forma de grânulos no interior do copo do nematoide (**Figura 3**), para obtenção de energia e manutenção do metabolismo (BIRD, 2003).



Figura 3: Juvenil de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* recém-eclodido

As setas indicam um grande numero de grãos de lipídios que promovem reservas energéticas antes de uma raiz hospedeira ser localizada e ter sua alimentação iniciada. O (S) é o estilete completamente retraído. Figura retirada de BIRD e KALOSHIAN, 2003.

O ciclo do glioxilato é uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA, que ocorre em plantas e em alguns microrganismos, transforma lipídeos em carboidratos, como ácidos graxos em glicose. Esta via metabólica está presente nos nematoides, que provavelmente são os únicos seres do Reino Animalia que o utilizam, e é fundamental para períodos em que ficam sem se alimentar (LOURENÇO, 2014 apud MCCARTER, et al., 2003).

Um gene homólogo a Isocitrato Liase, em *C. elegans*, é requerido para regular a longevidade e promover o desenvolvimento embrionário normal dos nematoides. O isolamento e utilização do fragmento gênico de Isocitrato Liase como gene-alvo se deve ao fato da via metabólica do glioxalato não esta presente em vertebrados (LOURENÇO, 2008), evitando efeitos cruzados indesejados ao consumidor, além de terem sido demonstrado redução do sucesso reprodutivo do nematoide (LOURENÇO, 2014).

3.5 Gene Proteína de Choque Térmico 90 – hsp90

O segundo gene selecionado foi a *HSP90*, proteína que está envolvida na modulação de outras proteínas e vias de sinalização. São requeridas para várias funções celulares, como: ativação e regulação de receptores de esteroides, proteínas quinases, vários fatores de transcrição, além de participar do transporte vesicular e regulação da telomerase (LOURENÇO, 2014 APUD PEARL; PRODROMOU, 2006).

Em *C. elegans* altas expressões do gene homólogo ao *HSP90*, a proteína DAF-21, foram responsáveis por alterações no desenvolvimento de gônadas da vulva e maturação dos oócitos. (GILLAN, et al., 2009). A DAF-21 também foi responsável por morte embriogênica e mutações morfológicas durante a oogênese (PIANO, et al., 2000). Vários outros estudos demonstraram defeitos em células musculares em nematoides (GAISER, et al., 2011), variedade de fenótipos, como patas e olhos deformados, anomalias nas asas, tórax e cerdas em *Drosophila melanogaster* (LOURENÇO, 2014 apud RUTHERFORD; LINDQUIST, 1998), a inibição da proteína *HSP90alpha1* incide na formação da ultraestrutura miofibrilar do musculo esquelético em embriões em de peixe-zebra (DU, et al., 2008).

Esta proteína foi escolhida como gene-alvo pelos diversos estudos apontando significativos efeitos deletérios, principalmente no desenvolvimento de embriões e na formação das estruturas musculares, além da verificada redução do sucesso reprodutivo em *M. incognita* (LOURENÇO, 2014).

3.6 Ponto de Início

Experimentos anteriores vinham sendo conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, liderado pela Dra. Maria Fatima Grossi de Sá, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Genes-alvo Isocitato Liase (IL) e Proteína do Choque Térmico 90 (*HSP90*) foram selecionados por FRAGOSO (2006), os fragmentos gênicos foram isolados e suas construções de RNAi subclonadas por LOURENÇO, (2008), as plantas de tabaco foram transformadas, genotipadas e tiveram a indução da resistência avaliada e publicada como resultado de tese de doutorado por LOURENÇO (2014) e ainda publicado em formato de artigo científico por LOURENÇO-TESSUTTI, et al., (2015).

Foram disponibilizados 5 eventos de transformação IL e outros 5 eventos de *HSP90*, todas em geração T3, isto é, foram autofecundadas por três gerações. Estas autofecundações garantem a presença de múltiplas cópias dos genes em diversas partes do genoma, evitando possíveis plantas não transformadas ou com cópias somente em um dos cromossomos.

Anteriormente LOURENÇO (2014) havia realizado a validação dos genes-alvo e concretizou as transformações genéticas por *Agrobacterium tumefaciens*, realizando o bioensaio com a raça 2 do fitonematoide *M. incognita*. Os resultados positivos para o uso destes genes levou ao interesse no possível efeito sinérgico que o silenciamento de ambos os genes podem vir a ter.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo

O cultivo de plantas de tabaco GM previamente transformadas para expressão de RNA dupla fita de genes essenciais de *M. incognita* IL e *hsp90* (LOURENÇO-TESSUTTI, et al., 2015) foram propagadas até a segunda geração transgênica (T2). A partir de sementes T2 foi feita a germinação das sementes das linhagens transgênicas. As sementes passaram por um processo de desinfestação utilizando álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio 1,5% por 20 min, seguidos por 5 lavagens em água bidestilada ultrafiltrada (milli-q) e permanecem em ambiente estéril até a secagem. Após este processo de desinfestação, as sementes foram dispersas em meio Murashige e Skoong (MS) seletivo contendo o antibiótico canamicina na concentração final 300 µg/mL em placas de cultivo. Neste meio, somente plantas GM com resistência ao antibiótico aplicado conseguem se desenvolver completamente.

Depois de aproximados 20 dias da germinação, as plântulas foram transferidas para magentas, onde permaneceram por mais 30 dias. Durante este tempo, cada planta é genotipada individualmente por teste PCR para confirmação do transgene.

Com as plântulas já desenvolvidas e com os genes presentes, foi feita a transferência para copos plásticos descartáveis de 300 mL contendo solo autoclavado. Estas plantas foram então levadas à casa de vegetação (**Figura 4**) para completarem seu ciclo.



Figura 4: Plantas de tabaco em Casa de Vegetação

4.2 Cruzamentos

Com aproximadamente 50 dias em casa de vegetação ocorre o surgimento dos primeiros botões florais, o estágio SI. Estes botões florais foram isolados por saquinhos de papel pardo por uma semana, até as flores quase se abrirem, no estágio IA (Figura 5). Após este período foi coletado, em microtubos (ependorfs), o pólen dos estames das flores que se abriram, no estágio MA. Os estádios fenológicos foram descritos por KNIES, et al., (2011).



Figura 5: Flores de *N. tabacum* no estágio MA.

As flores que permaneceram fechadas tiveram sua lateral cortada com a utilização de um bisturi, com cuidado para não atingir a base e nem o estigma da flor. Os estames destas flores, ainda sem pólen, foram cuidadosamente removidos e o pólen coletado anteriormente, proveniente da linhagem desejada, foi utilizado no estigma desta flor. Estas flores foram então isoladas com novos sacos de papel pardo até a formação dos frutos (**Figura 6**) e coleta das sementes.



Figura 6: Frutos de *N. tabacum*.

4.3 Extração do DNA

Para realizar a extração do DNA vegetal das plantas de tabaco foram coletados dois discos foliares e armazenados em nitrogênio líquido. Estes discos foram triturados com nitrogênio em microtubos e a eles foram adicionados 400 μ L de solução CTAB. Seguidamente foi feita a incubação a 60°C por 1 hora e após estes tempo foi adicionado 400 μ L clorofil gelado (24:1 clorofórmio:álcool isoamílico). O próximo passo foi uma centrifugação por 5 min

a 4000 rpm, onde o sobrenadante foi coletado e a ele adicionado 400 μ L de clorofil e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após a segunda centrifugação foi coletado o sobrenadante e adicionado isopropanol gelado que deve ser homogeneizado e deixado em descanso por 16 horas, seguido de uma centrifugação de 10 min a 4000 rpm. O próximo passo foi cuidadosamente descartar o sobrenadante e adicionar ao precipitado (pellet) o tampão de lavagem e seguir mais 15 min em descanso. A seguir foi feita uma nova centrifugação, 5min a 4000 rpm, e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado. O microtubo deve permanecer aberto para a total secagem e em seguida o DNA foi ressuspendido em 40 μ L de água Mili-q e, ao microtubo, foi também adicionado 1 μ L de RNase A que teve que agir por 1 hora a 37°C.

4.4 Genotipagem por PCR

A genotipagem foi feita utilizando o DNA extraído das plantas de interesse e com a utilização de primers previamente definidos para os genes que visamos amplificar.

Na PCR foi utilizado: o DNA das plantas, os primers para cada gene, a enzima Taq DNA polimerase, desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), tampão, magnésio e água mili-q. O gel de para corrida das amostras foi feito utilizando 1% de agarose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cruzamentos e Propagação

Em estudo anterior, foram gerados 5 eventos T0 de tabaco GM expressando dsRNA de cada gene-alvo (HSP90-1, -2, -4, -5 e -6; IL-1, -2, -3, -4 e -6) e autofecundados para geração de T1 correspondente. Bioensaios foram conduzidos com 10 indivíduos de cada família T1 e comparados com tabaco SR1 não transformado (NT), como controle. Os 2 melhores eventos de cada gene-alvo silenciado (*hsp90-1*, *hsp90-5*, IL-1 e IL-3) foram autofecundados e propagados a T2, gerando assim 4 subfamílias (*hsp90-1.1*, -1.2, -1.3 e -1.4; *hsp90-5.1*, -5.2, -5.3 e -5.4; IL-1.1, -1.2, -1.3 e -1.4; IL-3.1, -3.2, -3.3 e -3.4). Um segundo bioensaio com 8 indivíduos de cada sub-família foi conduzido resultando em maior redução com o silenciamento de IL e redução igual ou menor com o silenciamento de *hsp90*, talvez devido a segregação do transgene (LOURENÇO-TESSUTTI et al., 2015).

O cruzamento foi realizado com sucesso, implementando um protocolo eficiente para o cruzamento artificial de plantas de *N. tabacum*, além da otimização do cultivo e manejo destas plantas.

Inicialmente possuíamos a disposição os eventos de plantas parentais em T3 conforme a **Tabela 2**. Com estes eventos foram germinadas 5 plantas de cada e a partir destas plantas os cruzamentos foram realizados conforme a **Tabela 3**. Nem todos os eventos possuíram cruzamentos viáveis, devido principalmente à floração dessincronizada, sendo a queda das flores polinizadas e frutos com poucas sementes outros fatores que impediram um maior número de cruzamentos. As sementes dos cruzamentos foram coletadas e algumas germinadas para que fossem autofecundadas, visando à aderência dos genes em ambos os cromossomos e evitando a segregação dos genes, devido à meiose, nas gerações futuras.

Tabela2: Eventos de transformação disponíveis

Genes	Eventos					
IL	3.1	3.2	3.3	3.4	5.5	6.4
<i>hsp90</i>	1.2	1.3	1.4	5.2	5.3	5.5

Tabela 3: Cruzamentos de eventos realizados com sucesso

IL	x	<i>hsp90</i>
3.1	x	1.2
3.2	x	1.2
3.2	x	1.4
3.3	x	1.4
3.3	x	5.5
5.5	x	5.5

5.2 Genotipagem por PCR

Durante o experimento foram dadas letras alfabéticas para identificar as famílias de cruzamentos (**Tabela 4**), as avaliações para presença dos genes foram obtidas por visualização do fragmento gênico amplificado em gel de agarose 1% (**Figuras 7, 8, 9, e 10**). As demais famílias não obtiveram número de descendentes transformados suficientes e foram descontinuadas.

Tabela 4: Cruzamentos de eventos e suas identificações para PCR

ILx <i>hsp90</i>	Identificação
3.1x1.2	F
3.2x1.2	G
3.2x1.4	H
3.3x1.4	K
3.3x5.5	J
5.5x5.5	M

A genotipagem por PCR dos cruzamentos foi assegurada pela visualização de ampliações de fragmentos gênicos nas **Figuras 7, 8, 9, e 10**. A banda de aproximados 700 pb corresponde ao gene *hsp90*, enquanto a banda de aproximadamente 300 pb corresponde ao gene IL.



Figura 7: Gel com ampliações de fragmentos gênicos de plantas da família F

Avaliação para presença de genes *HSP 90* e IL. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. Marcador de massa molecular 1kb ladder plus da Invitrogen TM.

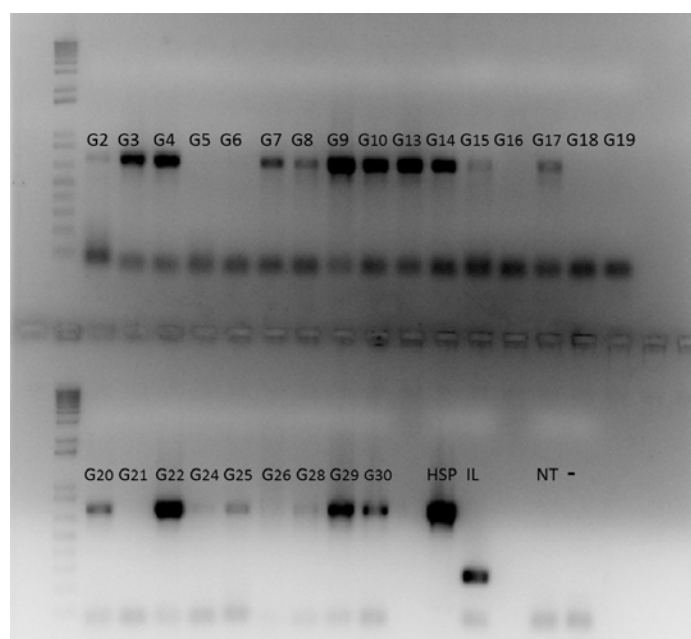


Figura 8: Gel com ampliações de fragmentos gênicos de plantas da família G

Avaliação para presença de genes *HSP90* e IL. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. Marcador de massa molecular 1kb ladder plus da Invitrogen TM.

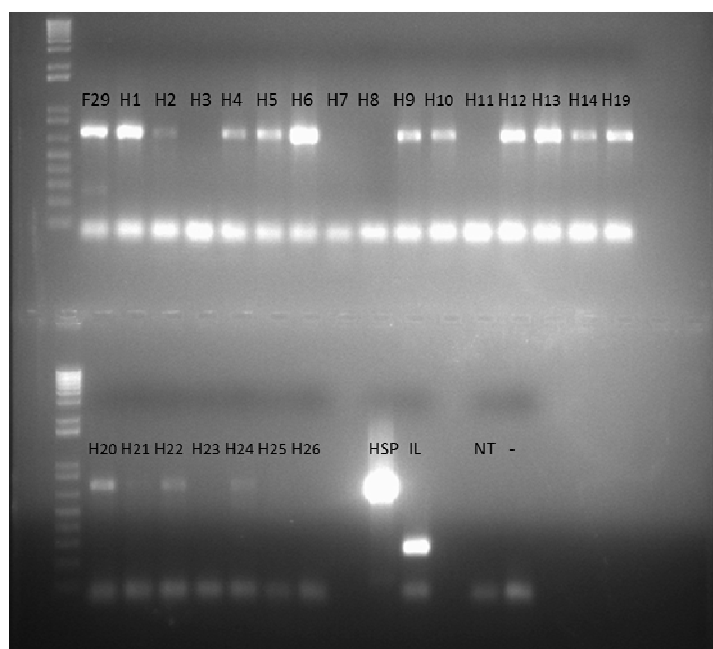


Figura 9: Gel com ampliações de fragmentos gênicos de plantas da família F e H
Avaliação para presença de genes *HSP 90* e IL. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. Marcador de massa molecular 1kb ladder plus da Invitrogen TM.

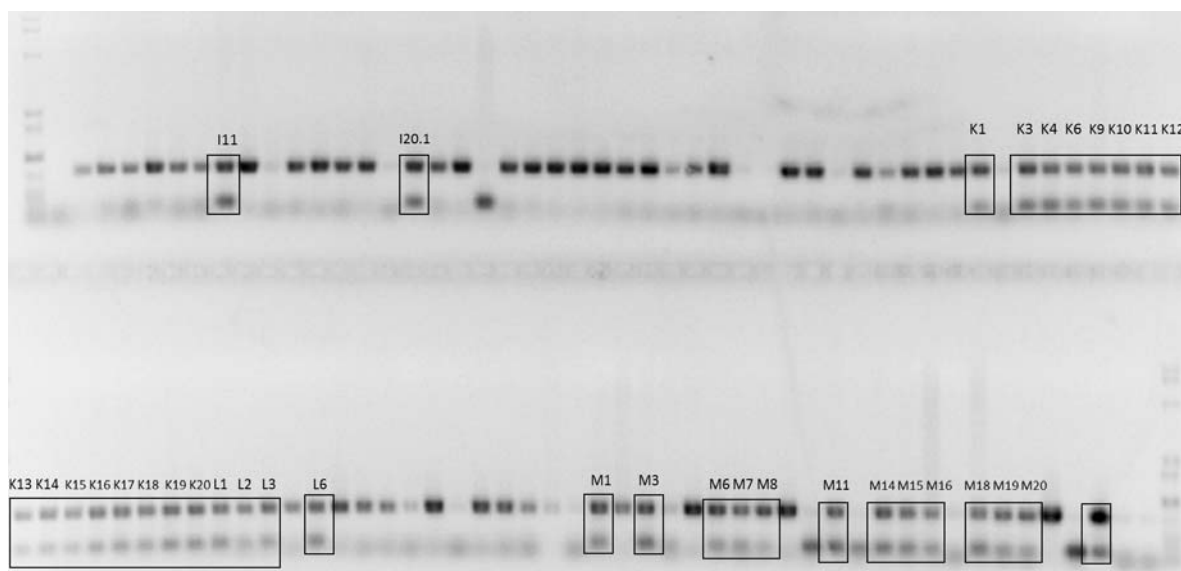


Figura 10: Gel com ampliações de fragmentos gênicos de plantas da família J, K, L e M
Avaliação para presença de genes *HSP 90* e IL. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. Marcador de massa molecular 1kb ladder plus da Invitrogen TM.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A obtenção de plantas híbridas, possuidoras dos dois cassetes de expressão de dsRNA, por estratégia de cruzamento foi concluída e se mostrou eficiente, diminuindo os gastos com outras alternativas de transformação. Estes gastos poderiam incluir a construção de novos vetores, sendo que a cada gene incluído ao vetor aumentaria o número de pb, o que dificultaria a transformação tanto da *Agrobacterium*, quanto da planta, já que a probabilidade de transformação é inversamente proporcional ao tamanho do plasmídeo.

Foram obtidos ao todo seis cruzamentos com quantidade de plantas e sementes suficientes para multiplicação e utilização durante bioensaios.

Como futuro deste projeto é proposta uma sequência de bioensaios com as plantas obtidas durante este experimento. Uma avaliação por qPCR, para garantir que as plantas cruzadas estarão realmente expressando os genes quando forem infectadas por nematoides.

7. REFERÊNCIAS

ARRUDA, K.M.A., Pyramiding of resistance genes to anthracnose, rust and angular leaf spot and allelism studies in common bean. 2009. 142 f. - **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, 2009.

Ayushi K.; Abira C.; Mohan K.; Asis D., Small RNAs in plants: Recent development and application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, V. 6, 2015.

BIRD, D.M. KALOSHIAN I., Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 62, n. 2. p. 115-123. 2003.

DU, S.J.; LI, H.; BIAN, Y.; ZHONG, Y., Heat-shock protein 90 α 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos, **PNAS - National Academy of Sciences**, 2008.

FAIRBAIRN, D.J.; CAVALLARO, A.S.; BERNARD, M.; MAHALINGA-IYER, J.; GRAHAM, M.W.; BOTELLA, J.R., Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. v. 226, n. 6. p. 1525-1533. 2007.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F., Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **NORMA EDITORA**, Manaus, 2016.

GAISER, A. M.; KAISER, C. J.; HASLBECK, V.; RICHTER, K., Downregulation of the Hsp90 system causes defects in muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. **PloS one**, v. 6, n. 9. p. e25485. 2011.

GILLAM, V.; MAITLAND, K.; McCORMACK, G.; NIK HIM, N.A.I.I.; DEVANEY, E., Functional genomics of hsp-90 in parasitic and free-living nematodes, **International Journal for Parasitology**, 2009.

HUGOT J-P, B.P., MORAND S., Biodiversity in helminthes and nematodes as a field of study: an overview., v. 3, n. p. 199-208. 2001.

JEYARATNAM, J., Acute pesticide poisoning: a major global health problem., **World Health Stat Q**. v. 43, n. 3. p. 139-144. 1990.

KNIES A.E.; CARLESSO R.; PETRY M.T.; DE OLIVEIRA Z. B.; DUBOU V.; GRASEL L.F., Caracterização do Desenvolvimento da Cultura do Tabaco. Apresentado no **XVII Congresso Brasileiro de Agrometeorologia** - SESC Centro de Turismo de Guarapari, Guarapari – ES, 2011.

LOURENÇO, I.T., Isolamento de genes e construção de vetores para o uso no silenciamento gênico de *Meloidogyne incognita*. 2008. 67 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - **Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília**, Brasília, 2008.

LOURENÇO, I.T., Validação funcional de genes envolvidos com estresse de *Meloidogyne incognita* via RNA interferente in planta. 2014. [151 f.], il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)—**Universidade de Brasília**, Brasília, 2014.

LOURENÇO-TESSUTTI, I.T.; SOUZA JUNIOR, J.D.; MARTINS-DE-SÁ, D.; VIANA, A.A.; CARNEIRO, R.M.; TOGAWA, R.C.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; BATISTA, J.A.; SILVA, M.C.; FRAGOSO, R.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; Knock-down of heat-shock protein 90 and isocitrate lyase gene expression reduced root-knot nematode reproduction, **ReserachGate**, 2015.

NG'AMBI, T. B.; RUFTY, R. C.; BARKER, K. R.; MELTON, T. A., Identification of Sources of Resistance to Four Species of Root-knot Nematodes in Tobacco. **Journal of nematology**, v. 31, n. 3. p. 272-282. 1999.

OBBARD, D. J.; GORDON, K. H.; BUCK, A. H.; JIGGINS, F. M., The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1513. p. 99-115. 2009.

FRAGOSO, R.R., Prospecção de moléculas-alvo para intervenção da interação planta-praga. 2006. 171 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-**Universidade de Brasília**, Brasília, 2006

PIANO, F.; SCHETTER, A. J.; MANGONE, M.; STEIN, L.; KEMPHUES, K. J., RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. v. 10, n. 24. p. 1619-1622. 2000.

SASSER, J. N., EISENBACK, J. D., CARTER, C. C. and TRIANTAPHYLLOU, A. C. The International *Meloidogyne* Project-Its Goals and Accomplishments. **Annual Review of Phytopathology**, Vol. 21: 271 -288, setembro, 1983.

